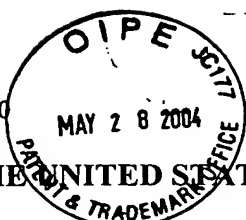


Docket No. 247848US0



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Seiichi HARA, et al.

GAU: 1635

SERIAL NO: 10/763,179

EXAMINER:

FILED: January 26, 2004

FOR: NOVEL PEPTIDE-FORMING ENZYME GENE

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☒ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e):
- | | |
|------------------------|-------------------|
| <u>Application No.</u> | <u>Date Filed</u> |
| 60/491,612 | August 1, 2003 |
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	2003-016765	January 24, 2003

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.
Norman F. Oblon

Vincent K. Shier, Ph.D.

Registration No. 50,552

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

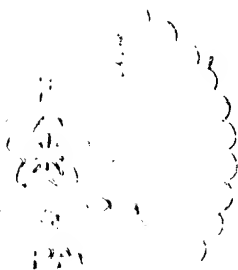
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 月 2 4 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 1 6 7 6 5
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 1 6 7 6 5]

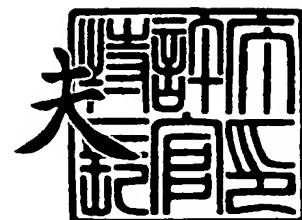
出 願 人 味の素株式会社
Applicant(s):



2 0 0 4 年 2 月 1 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 PAMA-15008

【提出日】 平成15年 1月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/00

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 番 1 号 味の素株式会社
内

【氏名】 原 誠一

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 番 1 号 味の素株式会社
内

【氏名】 横関 健三

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 番 1 号 味の素株式会社
内

【氏名】 阿部 巧

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 番 1 号 味の素株式会社
内

【氏名】 外内 尚人

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 番 1 号 味の素株式会社
内

【氏名】 城嶋 恭子

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089118

【弁理士】

【氏名又は名称】 酒井 宏明

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-218957

【出願日】 平成14年 7月26日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036711

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 原寄託についての受託証 2

【援用の表示】 手続補足書にて提出の受託証

【包括委任状番号】 0202890

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ペプチド生成酵素遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記 (A) または (B) に示すタンパク質をコードする DNA。

(A) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～616 のアミノ酸配列を有するタンパク質

(B) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～616 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

【請求項 2】 下記 (C) または (D) に示すタンパク質をコードする DNA。

(C) 配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 21～619 のアミノ酸配列を有するタンパク質

(D) 配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 21～619 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

【請求項 3】 下記 (E) または (F) に示すタンパク質をコードする DNA。

(E) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(F) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

【請求項 4】 下記 (G) または (H) に示すタンパク質をコードする DNA。

(G) 配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(H) 配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個の

アミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

【請求項5】 下記（a）または（b）に示すDNA。

（a）配列表の配列番号5に記載の塩基配列のうちの塩基番号127～1908の塩基配列からなるDNA

（b）配列表の配列番号5に記載の塩基配列のうちの塩基番号127～1908の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項6】 下記（c）または（d）に示すDNA。

（c）配列表の配列番号11に記載の塩基配列のうちの塩基番号121～1917の塩基配列からなるDNA

（d）配列表の配列番号11に記載の塩基配列のうちの塩基番号121～1917の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項7】 下記（e）または（f）に示すDNA。

（e）配列表の配列番号5に記載の塩基配列のうちの塩基番号61～1908の塩基配列からなるDNA

（f）配列表の配列番号5に記載の塩基配列のうちの塩基番号61～1908の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質をコードするDNA

【請求項8】 下記（g）または（h）に示すDNA。

（g）配列表の配列番号11に記載の塩基配列のうちの塩基番号61～1917の塩基配列からなるDNA

（h）配列表の配列番号11に記載の塩基配列のうちの塩基番号61～1917の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質をコードするDNA

【請求項 9】 前記ストリンジェントな条件が、 $1\times\text{SSC}$ 及び $0.1\% \text{SDS}$ に相当する塩濃度で 60°C で洗浄が行われる条件である、請求項 5 から 8 のいずれか一項に記載の DNA。

【請求項 10】 請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の DNA を有する組換え DNA。

【請求項 11】 請求項 10 に記載の組換え DNA が導入された形質転換細胞。

【請求項 12】 請求項 11 に記載の形質転換細胞を培地中で培養し、培地中および／または形質転換細胞中に、ペプチド生成酵素を蓄積させることを特徴とする、ペプチド生成酵素の製造方法。

【請求項 13】 請求項 11 に記載の形質転換細胞を培地中で培養して培養物を得、当該培養物とカルボキシ成分とアミン成分とを混合して、ジペプチドを合成する、ジペプチドの製造方法。

【請求項 14】 スフィンゴバクテリウム属に属し、カルボキシ成分とアミン成分とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、該微生物の菌体処理物、または、該微生物に由来するペプチド生成酵素を用いて、カルボキシ成分とアミン成分からジペプチドを製造することを特徴とするジペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、複雑な合成方法を経ることなく、簡便かつ高収率で安価にペプチドを製造できる新規酵素に関する。より詳細には、カルボキシ成分とアミン成分とからのペプチド合成反応を触媒する新規酵素、この酵素を生産する微生物、およびこの酵素もしくは微生物を使用するジペプチドの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ペプチドは、医薬品、食品等のさまざまな分野で利用されている。例えば、 L-アラニル-L-グルタミン は L-グルタミン に比べ安定かつ水溶性も高いこと

から、輸液や無血清培地の成分として広く用いられている。

【0003】

ペプチドの製造法としては従来から化学合成法が知られているが、その製造法は必ずしも簡便なものではなかった。例えば、N-ベンジルオキシカルボニルアラニン（以下Z-アラニンと称する）と保護L-グルタミンを用いる方法（Bull. Chem. Soc. Jpn., 34, 739(1961)、Bull. Chem. Soc. Jpn., 35, 1966(1962)）、Z-アラニンと保護L-グルタミン酸- γ -メチルエステルを用いる方法（Bull. Chem. Soc. Jpn., 37, 200(1964)）、Z-アラニンエステルと無保護グルタミン酸を用いる方法（特許文献1）、2-置換- γ -プロピオニルハロイドを原料として、N-（2-置換）- γ -プロピオニルグルタミン誘導体を中間体として合成する方法（特許文献2）等が知られている。

【0004】

しかしながら、いずれの方法においても、保護基の導入脱離、もしくは光学活性中間体の使用が必要であり、工業的に有利で十分に満足できる製造方法ではなかった。

【0005】

一方、酵素を用いたペプチドの代表的製造法としては、N保護、C無保護のカルボキシ成分とN無保護、C保護のアミン成分を用いる縮合反応（反応1）、および、N保護、C保護のカルボキシ成分とN無保護、C保護のアミン成分を用いる置換反応（反応2）が広く知られている。（反応1）の例としては、Z-アスパラギン酸とフェニルアラニンメチルエステルからのZ-アスパルチルフェニルアラニンメチルエステルの製造方法（特許文献3）、（反応2）の例としてはアセチルフェニルアラニンエチルエステルとロイシンアミドからのアセチルフェニルアラニルロイシンアミドの製造方法（非特許文献1）が挙げられる。N無保護、C保護のカルボキシ成分を用いる方法の報告研究例は極めて少なく、N無保護、C保護のカルボキシ成分とN無保護、C保護のアミン成分を用いる置換反応（反応3）の例としては特許W0 90/01555（特許文献4）があり、例えばアルギニンエチルエステルとロイシンアミドからのアルギニルロイシンアミドの製造方法が挙げられる。N無保護、C保護のカルボキシ成分とN無保護、C無保護のアミ

ン成分を用いる置換反応（反応４）の例としては、特許EP 278787A1（特許文献５）とEP 359399B1（特許文献６）があり、例えばチロシンエチルエステルとアラニンからのチロシルアラニンの製造方法が挙げられる。

【0006】**【特許文献１】**

特開平 1-96194 号公報

【特許文献２】

特開平 6-234715 号公報

【特許文献３】

特開昭 53-92729 号公報

【特許文献４】

WO 90/01555 号公報

【特許文献５】

EP 278787A1 号公報

【特許文献６】

EP 359399B1 号公報

【非特許文献１】

Biochemical J., 163, 531 (1977)

【0007】**【発明が解決しようとする課題】**

上記の（反応１）から（反応４）の方法の中で最も安価な製造方法となり得るのは、当然ながら保護基の数が最も少ない（反応４）の範疇に入る反応である。

【0008】

しかしながら、（反応４）の先行例（特許EP 278787A1）には以下の大きな問題点があった。（１）ペプチド生成速度が極めて遅い、（２）ペプチド生成収率が低い、（３）生産できるペプチドが比較的疎水度の高いアミノ酸を含むものに限られる、（４）添加酵素量が極めて大量、（５）カビ、酵母、植物に由来する比較的高価なカルボキシペプチダーゼ標品が必要。（反応４）において、細菌およびサッカロミセス（*Saccharomyces*）属以外の酵母由来の酵素を用いる方法

は全く知られておらず、また 親水性の高いアラニルグルタミン等のペプチドの製造方法についても全く知られていなかった。このような背景の下、これらペプチドの工業的安価な製造法の開発が望まれていた。

【0009】

本発明は、複雑な合成方法を経ることなく、簡便かつ高収率で安価にペプチドを製造できる新規酵素を提供することを課題とする。より詳細には、カルボキシ成分とアミン成分とからのペプチド合成反応を触媒する新規酵素、この酵素を生産する微生物、およびこの酵素もしくは微生物を使用する安価なペプチドの製造方法を提供することを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

上記目的に鑑み鋭意研究を重ねた結果、本発明者らは新たに見出したエンペドバクター (Empedobacter) 属に属する細菌からペプチドを効率良く合成する新規酵素を見出し、この酵素遺伝子の配列を決定することにより本発明を完成するに至った。

【0011】

即ち、本発明は、以下のとおりである。

〔1〕 下記 (A) または (B) に示すタンパク質をコードする DNA。

(A) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～616 のアミノ酸配列を有するタンパク質

(B) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～616 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

〔2〕 下記 (C) または (D) に示すタンパク質をコードする DNA。

(C) 配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 21～619 のアミノ酸配列を有するタンパク質

(D) 配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 21～619 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿

入、付加、または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

〔3〕 下記（E）または（F）に示すタンパク質をコードするDNA。

（E）配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

（F）配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

〔4〕 下記（G）または（H）に示すタンパク質をコードするDNA。

（G）配列表の配列番号12に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

（H）配列表の配列番号12に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

〔5〕 下記（a）または（b）に示すDNA。

（a）配列表の配列番号5に記載の塩基配列のうちの塩基番号127～1908の塩基配列からなるDNA

（b）配列表の配列番号5に記載の塩基配列のうちの塩基番号127～1908の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNA

〔6〕 下記（c）または（d）に示すDNA。

（c）配列表の配列番号11に記載の塩基配列のうちの塩基番号121～1917の塩基配列からなるDNA

（d）配列表の配列番号11に記載の塩基配列のうちの塩基番号121～1917の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNA

〔7〕 下記（e）または（f）に示すDNA。

（e）配列表の配列番号5に記載の塩基配列のうちの塩基番号61～1908の塩基配列からなるDNA

（f）配列表の配列番号5に記載の塩基配列のうちの塩基番号61～1908の

塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質をコードするDNA

〔8〕 下記 (g) または (h) に示すDNA。

(g) 配列表の配列番号 11 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 61～1917 の塩基配列からなるDNA

(h) 配列表の配列番号 11 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 61～1917 の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質をコードするDNA

〔9〕 前記ストリンジェントな条件が、 $1\times\text{SSC}$ 及び $0.1\%\text{SDS}$ に相当する塩濃度で 60°C で洗浄が行われる条件である、上記〔5〕から〔8〕のいずれか一項に記載のDNA。

〔10〕 上記〔1〕から〔9〕のいずれか一項に記載のDNAを有する組換えDNA。

〔11〕 上記〔10〕に記載の組換えDNAが導入された形質転換細胞。

〔12〕 上記〔11〕に記載の形質転換細胞を培地中で培養し、培地中および／または形質転換細胞中に、ペプチド生成酵素を蓄積させることを特徴とする、ペプチド生成酵素の製造方法。

〔13〕 上記〔11〕に記載の形質転換細胞を培地中で培養して培養物を得、当該培養物とカルボキシ成分とアミン成分とを混合して、ジペプチドを合成する、ジペプチドの製造方法。

〔14〕 スフィンゴバクテリウム属に属し、カルボキシ成分とアミン成分とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、該微生物の菌体処理物、または、該微生物に由来するペプチド生成酵素を用いて、カルボキシ成分とアミン成分からジペプチドを製造することを特徴とするジペプチドの製造方法。

【0012】

なお、配列表の配列番号 5 に記載のDNAにより、配列番号 6 に記載のアミノ

酸配列が特定される。また、配列番号 11 に記載の DNA により、配列番号 12 に記載のアミノ酸配列が特定される。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の新規ジペプチド生成酵素遺伝子とその遺伝子産物であるジペプチド生成酵素について詳細に説明する。

【0014】

(1) 本発明の DNA を有する微生物

本発明の DNA は、カルボキシ成分とアミン成分とからペプチドを生成する能力を有するタンパク質をコードするものである。本明細書において、カルボキシ成分とは、ペプチド結合 ($-CONH-$) におけるカルボニル部位 (CO) を供給する成分のことをいい、アミン成分とは、ペプチド結合におけるアミノ部位 (NH) を供給する成分のことをいう。また、本明細書において、単に「ペプチド」というときは、特に断らない限り、少なくとも 1 つ以上のペプチド結合を有するポリマーのことをいう。また、本明細書において「ジペプチド」とは 1 つのペプチド結合を有するペプチドのことをいう。

【0015】

本発明の DNA を有する微生物としては、例えばエンペドバクター属に属する細菌、もしくはスフィンゴバクテリウム属に属する細菌などが挙げられ、より具体的にはエンペドバクター ブレビス (*Empedobacter brevis*) ATCC 14234 株 (FERM P-18545 株、FERM BP-8113 株)、スフィンゴバクテリウム エスピー (*Sphingobacterium* sp.) FERM BP-8124 株が挙げられる。エンペドバクター ブレビス

ATCC 14234 株 (FERM P-18545 株、FERM BP-8113 株) もしくはスフィンゴバクテリウム エスピー (*Sphingobacterium* sp.) FERM BP-8124 株は、本発明者らが、カルボキシ成分とアミン成分からペプチドを高収率で生産する酵素の生産菌を検索した結果に選出した微生物である。

【0016】

エンペドバクター ブレビス ATCC 14234 株 (FERM P-18545 株、FERM BP-8113 株) は、2001 年 10 月 1 日に独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄

託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地 中央第6）に寄託され、FERM-18545の受託番号が付与され、さらに平成14年7月8日に、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにおいて、ブダペスト条約に基づく寄託へ移管され、FERM BP-8113が付与された微生物である（微生物の表示: *Empedobacter brevis* AJ-13933株）。

【0017】

スフィンゴバクテリウム エスピー AJ 110003株は、2002年7月22日に独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに寄託され、FERM BP-8124の受託番号が付与されている。尚、AJ 110003(FERM BP-8124)は、以下の分類実験により、上述のスフィンゴバクテリウム エスピーであることが同定された。FERM BP-8124株は、桿菌（ $0.7\sim0.8\times1.5\sim2.0\mu\text{m}$ ）、グラム陰性、孢子形成なし、運動性なし、コロニー形態は円形、全縁滑らか、低凸状、光沢あり、淡黄色、30℃で生育、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性、OFテスト（グルコース）陰性の性質より、スフィンゴバクテリウムに属する細菌と同定された。更に、硝酸塩還元陰性、インドール産生陰性、グルコースからの産生陰性、アルギニンジヒドロラーゼ陰性、ウレアーゼ陽性、エスクリン加水分解陽性、ゼラチン加水分解陰性、 β -ガラクトシダーゼ陽性、グルコース資化陽性、L-アラビノース資化陰性、D-マンノース資化陽性、D-マンニトール資化陰性、N-アセチル-D-グルコサミン資化陽性、マルトース資化陽性、グルコン酸カリウム資化陰性、n-カプリン酸陰性、アジピン酸資化陰性、d,l-リンゴ酸資化陰性、クエン酸ナトリウム資化陰性、酢酸フェニル資化陰性、チトクロームオキシダーゼ陽性の性質より、スフィンゴバクテリウム マルチボラムあるいはスフィンゴバクテリウム スピリチボラムの性状に類似することが判明した。更に16SrRNA遺伝子の塩基配列のホモロジー解析の結果、スフィンゴバクテリウム マルチボラムと最も高いホモロジー(98.8%)を示したが、完全に一致する株はなかったことより、本菌株をスフィンゴバクテリウム エスピー (*Sphingobacterium* sp.) と同定した。

【0018】

(2) 微生物の培養

本発明のDNAを有する微生物の培養菌体を得るには、当該微生物を適当な培地で培養増殖せしめるとよい。このための培地はその微生物が増殖し得るものであれば特に制限はなく、通常炭素源、窒素源、リン源、硫黄源、無機イオン、更に必要に応じ有機栄養源を含む通常の培地でよい。

【0019】

例えば、炭素源としては上記微生物が利用可能であればいずれも使用でき、具体的には、グルコース、フラクトース、マルトース、アミロース等の糖類、ソルビトール、エタノール、グリセロール等のアルコール類、フマル酸、クエン酸、酢酸、プロピオン酸などの有機酸類及びこれらの塩類、パラフィンなどの炭水化物類あるいはこれらの混合物などを使用することができる。

【0020】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムなどの無機塩のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウムなどの有機酸のアンモニウム塩、硝酸ナトリウム、硝酸カリウムなどの硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーンステープリカーなどの有機窒素化合物あるいはこれらの混合物を使用することができる。

【0021】

他に無機塩類、微量金属塩、ビタミン類等、通常の培地に用いられる栄養源を適宜混合して用いることができる。

【0022】

培養条件にも格別の制限はなく、例えば、好気的条件下にてpH 5～8、温度15～40℃の範囲でpHおよび温度を適当に制限しつつ12～48時間程度培養を行えばよい。

【0023】

(3) 酵素の精製

本発明のDNAは、ペプチド生成酵素をコードするDNAである。このペプチド生成酵素は、例えばエンペドバクター属に属する細菌から精製することができる。当該酵素を精製する例として、エンペドバクター ブレビスからペプチド生成酵素を単離・精製する方法を説明する。

【0024】

まず、エンペドバクター プレビス、例えばFERM BP-8113株の菌体から、超音波破碎等の物理的方法、あるいは細胞壁溶解酵素等を用いた酵素法等により菌体を破壊し、遠心分離等により不溶性画分を除いて菌体抽出液を調製する。このようにして得られる菌体抽出液を、通常のタンパク質の精製法、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどを組み合わせて分画することによって、ペプチド生成酵素を精製することができる。

【0025】

陰イオン交換クロマトグラフィー用の担体としては、Q-Sepharose HP（アマシャム社製）が挙げられる。本酵素を含む抽出液をこれらの担体を詰めたカラムに通液させると当該酵素は pH8.5 の条件下で非吸着画分に回収される。

【0026】

陽イオンクロマトグラフィー用担体としては、MonoS HR（アマシャム社製）が挙げられる。本酵素を含む抽出液をこれらの担体を詰めたカラムに通液させて本酵素をカラムに吸着させ、カラムを洗浄した後に、高塩濃度の緩衝液を用いて酵素を溶出させる。その際、段階的に塩濃度を高めてもよく、濃度勾配をかけてもよい。例えば、MonoS HRを用いた場合には、カラムに吸着した本酵素は、0.2～0.5 M程度のNaClで溶出される。

【0027】

上記のようにして精製された本酵素は、さらにゲル濾過クロマトグラフィー等により均一に精製できる。ゲル濾過クロマトグラフィー用担体としては、Sephadex 200pg（アマシャム社製）が挙げられる。

【0028】

上記精製操作において、本酵素を含む画分は、後述する方法等により各画分のペプチド生成活性を測定することにより、確認することができる。上記のようにして精製された本酵素の内部アミノ酸配列を、配列表の配列番号1及び配列番号2に示す。

【0029】

(4) 本発明のDNAおよび形質転換体

(4-1) 本発明のDNA

本発明のDNAである配列番号5に記載の塩基番号61～1908の塩基配列からなるDNAは、エンペドバクター ブレビス FERM BP-8113株より単離されたものである。配列番号5に記載の塩基番号61～1908の塩基配列からなるDNAは、コードシーケンス(CDS)部分である。塩基番号61～1908の塩基配列には、シグナル配列領域と成熟タンパク質領域とが含まれている。シグナル配列領域は塩基番号61～126の領域であり、成熟タンパク質領域は塩基番号127～1908の領域である。すなわち、本発明は、シグナル配列を含むペプチド酵素タンパク質遺伝子と、成熟したタンパク質としてのペプチド酵素タンパク質遺伝子の双方を提供する。配列番号5に記載の配列に含まれるシグナル配列は、リーダー配列の類であり、リーダー配列がコードするリーダーペプチドの主たる機能は、細胞膜内から細胞膜外に分泌させることにありと推定される。塩基番号127～1908でコードされるタンパク質、すなわちリーダーペプチドを除く部位が成熟タンパク質であり、高いペプチド生成活性を示すと推定される。

【0030】

本発明のDNAである配列番号11に記載の塩基番号61～1917の塩基配列からなるDNAは、スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株より単離されたものである。配列番号11に記載の塩基番号61～1917の塩基配列からなるDNAは、コードシーケンス(CDS)部分である。塩基番号61～1917の塩基配列には、シグナル配列領域と成熟タンパク質領域とが含まれている。シグナル配列領域は塩基番号61～120の領域であり、成熟タンパク質領域は塩基番号121～1917の領域である。すなわち、本発明は、シグナル配列を含むペプチド酵素タンパク質遺伝子と、成熟したタンパク質としてのペプチド酵素タンパク質遺伝子の双方を提供する。配列番号5に記載の配列に含まれるシグナル配列は、リーダー配列の類であり、当該リーダー配列領域にコードされるリーダーペプチドの主たる機能は、細胞膜内から細胞膜外に分泌させることにありと推定される。塩基番号121～1917でコードされるタンパク質、す

なわちリーダーペプチドを除く部位が成熟タンパク質であり、高いペプチド生成活性を示すと推定される。

【0031】

なお、以下に挙げる種々の遺伝子組換え技法については、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989)などの記載に準じて行うことができる。

【0032】

本発明のDNAは、エンペドバクター プレビス、もしくはスフィンゴバクテリウム エスピーの染色体DNA、もしくはDNAライブラリーから、PCR (polymerase chain reaction, White, T.J. et al ; Trends Genet., 5, 185(1989) 参照) またはハイブリダイゼーションによって取得することができる。PCRに用いるプライマーは、上記(3)の欄で説明したようにして精製されたペプチド生成酵素に基づいて決定された内部アミノ酸配列に基づいて設計することができる。また、本発明によりペプチド生成酵素遺伝子(配列番号5および配列番号11)の塩基配列が明らかになったので、これらの塩基配列に基づいてプライマーまたはハイブリダイゼーション用のプローブを設計することもでき、プローブを使って単離することもできる。PCR用のプライマーとして、5'非翻訳領域及び3'非翻訳領域に対応する配列を有するプライマーを用いると、本酵素のコード領域全長を増幅することができる。配列番号5に記載された、リーダー配列および成熟タンパク質コード領域の双方を含む領域を増幅する場合を例にとると、具体的には、5'側プライマーとしては配列番号5において塩基番号61よりも上流の領域の塩基配列を有するプライマーが、3'側プライマーとしては塩基番号1908よりも下流の領域の塩基配列に相補的な配列を有するプライマーが挙げられる。

【0033】

プライマーの合成は、例えば、Applied Biosystems社製DNA合成機 model 380Bを使用し、ホスホアミダイト法を用いて(Tetrahedron Letters(1981), 22, 1859 参照) 常法に従って合成できる。PCR反応は、例えばGene Amp PCR System 9600 (PERKIN ELMER社製) 及びTaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kit (宝酒造社製)

を用い、各メーカーなど供給者により指定された方法に従って行うことができる。

【0034】

本発明のDNAには、リーダー配列を含む場合および含まない場合のいずれにせよ、配列表の配列番号5に記載のCDSからなるDNAと実質的に同一のDNAも含まれる。すなわち、変異を有する本酵素をコードするDNAまたはこれを保持する細胞などから、配列表の配列番号5に記載のCDSと相補的な塩基配列からなるDNAもしくは同塩基配列から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、本発明のDNAと実質的に同一のDNAが得られる。

【0035】

本発明のDNAには、リーダー配列を含む場合および含まない場合のいずれにせよ、配列表の配列番号11に記載のCDSからなるDNAと実質的に同一のDNAも含まれる。すなわち、変異を有する本酵素をコードするDNAまたはこれを保持する細胞などから、配列表の配列番号11に記載のCDSと相補的な塩基配列からなるDNAもしくは同塩基配列から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、本発明のDNAと実質的に同一のDNAが得られる。

【0036】

プローブは、例えば配列番号5に記載の塩基配列に基づいて定法により作製することができる。また、プローブを用いてこれとハイブリダイズするDNAをつくり上げ、目的とするDNAを単離する方法も、定法に従って行えばよい。例えば、DNAプローブはプラスミドやファージベクターにクローニングされた塩基配列を増幅し、プローブとして用いたい塩基配列を制限酵素により切り出し、抽出して調製することができる。切り出す箇所は、目的とするDNAに応じて調節することができる。

【0037】

ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の発現ベクターにつなぎ、適当な宿主で発現させて、発現産物の酵素活性を後述の方法で測定することによって容易に取り除くことができる。

【0038】

ただし、上記のようにストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列の場合には、50℃、pH8の条件下で、元となる塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質の半分程度以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の酵素活性を保持していることが望ましい。例えば、配列番号5に記載の塩基配列のうち塩基番号127～1908にの塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列の場合について説明すると、50℃、pH8の条件下で、配列番号6に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号23～616のアミノ酸配列を有するタンパク質の半分程度以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の酵素活性を保持していることが望ましい。

【0039】

配列表の配列番号5に記載のCDSによりコードされるアミノ酸配列は、配列表の配列番号6に示される。また、配列表の配列番号11に記載のCDSによりコードされるアミノ酸配列は、配列表の配列番号12に示される。配列番号6に記載されたアミノ酸配列の全体には、リーダーペプチドと成熟タンパク質領域が

含まれ、アミノ酸残基番号 1～22 までがリーダーペプチドにあたり、23～616 までが成熟タンパク質領域である。また、配列番号 11 に記載されたアミノ酸配列の全体には、リーダーペプチドと成熟タンパク質領域が含まれ、アミノ酸残基番号 1～20 までがリーダーペプチドにあたり、21～619 までが成熟タンパク質領域である。

【0040】

本発明の DNA によりコードされるタンパク質は、その成熟タンパク質がペプチド生成活性を有するタンパク質である。リーダーペプチドを含むか含まないかに関わらず、配列表の配列番号 6 もしくは配列番号 12 に記載されたアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードする DNA も、本発明の DNA に含まれる（なお、ユニバーサルコドンのコードに従ってアミノ酸配列から塩基配列は特定される）。すなわち、本発明により、以下の（A）から（H）に示される DNA が提供される。

【0041】

（A）配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～616 のアミノ酸配列を有するタンパク質

（B）配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～616 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

【0042】

（C）配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 21～619 のアミノ酸配列を有するタンパク質

（D）配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 21～619 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

【0043】

（E）配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(F) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

【0044】

(G) 配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(H) 配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

【0045】

ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造や活性を大きく損なわない範囲のものであり、具体的には、2～50個、好ましくは2～30個、さらに好ましくは2～10個である。ただし、(B)、(D)、(F)、(H)のタンパク質のアミノ酸配列において1または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を含むアミノ酸配列の場合には、50℃、pH8の条件下で、変異を含まない状態でのタンパク質の半分程度以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の酵素活性を保持していることが望ましい。例えば、(B)の場合について説明すると、(B)配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において1または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を含むアミノ酸配列の場合には、50℃、pH8の条件下で配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質の半分程度以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の酵素活性を保持していることが望ましい。

【0046】

上記(B)などに示されるようなアミノ酸の変異は、例えば部位特異的変異法によって、本酵素遺伝子の特定の部位のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加されるように塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている突然変異処理によっても取得され得る。突然変異処理としては、本酵素をコードするDNAをヒドロキシルアミン等でインビト

口処理する方法、及び本酵素をコードするDNAを保持するエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常人工突然変異に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

【0047】

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、微生物の種あるいは菌株による差等、天然に生じる変異も含まれる。上記のような変異を有するDNAを適当な細胞で発現させ、発現産物の本酵素活性を調べることにより、配列表の配列番号6または12に記載のタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。

【0048】

(4-2) 形質転換体の作製およびペプチド生成酵素の生成

本発明のDNAを適当な宿主に導入し、発現させることによってペプチド生成酵素を生成することができる。

【0049】

本発明のDNAにより特定されるタンパク質を発現させるための宿主としては、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) 等のエシェリヒア属細菌、エンペドバクター属細菌、スフィンゴバクテリウム属細菌、フラボバクテリウム属細菌、及びバチルス ズブチリス (*Bacillus subtilis*) をはじめとする種々の原核細胞、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピヒア ステイピティス (*Pichia stipitis*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) をはじめとする種々の真核細胞を用いることができる。

【0050】

本発明のDNAを宿主に導入するのに用いる組換えDNAは、発現させようとする宿主の種類に応じたベクターに、本発明のDNAを、該DNAがコードするタンパク質が発現可能な形態で挿入することで調製可能である。本発明のDNAを発現させるためのプロモータとしては、エンペドバクター プレビスなどのペプチド生成酵素遺伝子固有のプロモータが宿主細胞で機能する場合には該プロモータを使用することができる。また、必要に応じて宿主細胞で働く他のプロモ-

タを本発明のDNAに連結し、該プロモータ制御下で発現させるようにしてもよい。

【0051】

組換えDNAを宿主細胞に導入するための形質転換法としては、D.M.Morrisonの方法 (Methods in Enzymology 68, 326 (1979)) あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) 等が挙げられる。

【0052】

タンパク質を組換えDNA技術を用いて大量生産する場合、該タンパク質を生産する形質転換体内で該タンパク質が会合し、タンパク質の封入体 (inclusion body) を形成させる形態も好ましい一実施形態として挙げられる。この発現生産方法の利点は、目的のタンパク質を菌体内に存在するプロテアーゼによる消化から保護する点および目的のタンパク質を菌体破碎に続く遠心分離操作によって簡単に精製できる点等である。

【0053】

このようにして得られるタンパク質封入体は、タンパク質変性剤により可溶化され、主にその変性剤を除去することによる活性再生操作を経た後、正しく折り畳まれた生理的に活性なタンパク質に変換される。例えば、ヒトインターロイキン-2の活性再生 (特開昭61-257931号公報) 等多くの例がある。

【0054】

タンパク質封入体から活性型タンパク質を得るためには、可溶化・活性再生等の一連の操作が必要であり、直接活性型タンパク質を生産する場合よりも操作が複雑になる。しかし、菌体の生育に影響を及ぼすようなタンパク質を菌体内で大量に生産させる場合は、不活性なタンパク質封入体として菌体内に蓄積させることにより、その影響を抑えることができる。

【0055】

目的タンパク質を封入体として大量生産させる方法として、強力なプロモータの制御下、目的のタンパク質を単独で発現させる方法の他、大量発現することが知られているタンパク質との融合タンパク質として発現させる方法がある。

【0056】

以下、形質転換された大腸菌を作製し、これを用いてペプチド生成酵素を製造する方法を例として、より具体的に説明する。なお、大腸菌などの微生物にペプチド生成酵素を作製させる場合、タンパク質のコード配列として、リーダー配列を含む前駆タンパク質をコードするDNAを組み込んでも、リーダー配列を含まない成熟タンパク質領域のDNAのみを組み込んでもよく、作製しようとする酵素の製造条件、形態、使用条件などにより適宜選択することができる。

【0057】

ペプチド生成酵素をコードするDNAを発現させるプロモータとしては、通常大腸菌における異種タンパク質生産に用いられるプロモータを使用することができる。例えば、T7プロモータ、lacプロモータ、trpプロモータ、trcプロモータ、tacプロモータ、ラムダファージのPRプロモータ、PLプロモータ等の強力なプロモータが挙げられる。また、ベクターとしては、pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218等を用いることができる。他にもファージDNAのベクターも利用できる。さらに、プロモータを含み、挿入DNA配列を発現させることができる発現ベクターを使用することもできる。

【0058】

ペプチド生成酵素を融合タンパク質封入体として生産させるためには、ペプチド生成酵素遺伝子上流あるいは下流に、他のタンパク質、好ましくは親水性であるペプチドをコードする遺伝子を連結して、融合タンパク質遺伝子とする。このような他のタンパク質をコードする遺伝子としては、融合タンパク質の蓄積量を増加させ、変性・再生工程後に融合タンパク質の溶解性を高めるものであればよく、例えば、T7 gene 10、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、デヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、インターフェロ γ 遺伝子、インターロイキン-2遺伝子、プロキモシン遺伝子等が候補として挙げられる。

【0059】

これらの遺伝子とペプチド生成酵素をコードする遺伝子とを連結する際には、コドンの読み取りフレームが一致するようにする。適当な制限酵素部位で連結す

るか、あるいは適当な配列の合成DNAを利用すればよい。

【0060】

また、生産量を増大させるためには、融合タンパク質遺伝子の下流に転写終結配列であるターミネータを連結することが好ましい場合がある。このターミネータとしては、T7ターミネータ、fdファージターミネータ、T4ターミネータ、テトラサイクリン耐性遺伝子のターミネータ、大腸菌trpA遺伝子のターミネータ等が挙げられる。

【0061】

ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質をコードする遺伝子が大腸菌に導入するためのベクターとしては、いわゆるマルチコピー型のものが好ましく、ColE1由来の複製開始点を有するプラスミド、例えばpUC系のプラスミドやpBR322系のプラスミドあるいはその誘導体が挙げられる。ここで、「誘導体」とは、塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位などによってプラスミドに改変を施したものを意味する。なお、ここでいう改変とは、変異剤やUV照射などによる変異処理、あるいは自然変異などによる改変をも含む。

【0062】

また、形質転換体を選別するために、該ベクターがアンピシリン耐性遺伝子等のマーカーを有することが好ましい。このようなプラスミドとして、強力なプロモータを持つ発現ベクターが市販されている（pUC系（宝酒造（株）製）、pPROK系（クローンテック製）、pKK233-2（クローンテック製）ほか）。

【0063】

プロモータ、ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質をコードする遺伝子、場合によってはターミネータの順に連結したDNA断片と、ベクターDNAとを連結して組換えDNAを得る。

【0064】

該組換えDNAを用いて大腸菌を形質転換し、この大腸菌を培養すると、ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質が発

現生産される。形質転換される宿主は、異種遺伝子の発現に通常用いられる株を使用することができるが、エシェリヒア コリ JM109株が好ましい。形質転換を行う方法、および形質転換体を選別する方法はMolecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989)等に記載されている。

【0065】

融合タンパク質として発現させた場合、血液凝固因子Xa、カリクレインなどの、ペプチド生成酵素内に存在しない配列を認識配列とする制限プロテアーゼを用いてペプチド生成酵素を切り出せるようにしてもよい。

【0066】

生産培地としては、M9ーカザミノ酸培地、LB培地など、大腸菌を培養するために通常用いる培地を用いてもよい。また、培養条件、生産誘導条件は、用いたベクターのマーカ、プロモータ、宿主菌等の種類に応じて適宜選択する。

【0067】

ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質を回収するには、以下の方法などがある。ペプチド生成酵素あるいはその融合タンパク質が菌体内に可溶化されていれば、菌体を回収した後、菌体を破碎あるいは溶菌させ、粗酵素液として使用できる。さらに、必要に応じて、通常の沈澱、濾過、カラムクロマトグラフィー等の手法によりペプチド生成酵素あるいはその融合タンパク質を精製して用いることも可能である。この場合、ペプチド生成酵素あるいは融合タンパク質の抗体を利用した精製法も利用できる。

【0068】

タンパク質封入体が形成される場合には、変性剤でこれを可溶化する。菌体タンパク質とともに可溶化してもよいが、以降の精製操作を考慮すると、封入体を取り出して、これを可溶化するのが好ましい。封入体を菌体から回収するには、従来公知の方法で行えばよい。例えば、菌体を破壊し、遠心分離操作等によって封入体を回収する。タンパク質封入体を可溶化させる変性剤としては、グアニジン塩酸（例えば、6M、pH5～8）や尿素（例えば8M）などが挙げられる。

【0069】

これらの変性剤を透析等により除くと、活性を有するタンパク質として再生さ

れる。透析に用いる透析溶液としては、トリス塩酸緩衝液やリン酸緩衝液などを用いればよく、濃度としては20 mM～0.5 M、pHとしては5～8が挙げられる。

【0070】

再生工程時のタンパク質濃度は、500 μ g/ml程度以下に抑えるのが好ましい。再生したペプチド生成酵素が自己架橋を行うのを抑えるために、透析温度は5℃以下であることが好ましい。また、変性剤除去の方法として、この透析法のほか、希釈法、限外濾過法などがあり、いずれを用いても活性の再生が期待できる。

【0071】

(5) 本発明のDNAでコードされる酵素の性質

本発明のDNAがコードする酵素の活性は、例えばアミノ酸エステルとアミンを基質として含むホウ酸緩衝液中で反応させ、生成したペプチドを定量することにより測定できる。より具体的な例としては、L-アラニンメチルエステル 100 mM、L-グルタミン 200 mMを含む100 mMホウ酸緩衝液 (pH 9.0) を用いて、25℃で数分反応させる方法が挙げられる。

【0072】

本発明に用いられる酵素の活性単位については、L-アラニンメチルエステル 100 mM、L-グルタミン 200 mMを含む100 mMホウ酸緩衝液 (pH 9.0) を用いて、25℃で反応させた条件で、1分間に1 μ moleのペプチドを生成する酵素量を1単位 (U) と定義した。

【0073】

本発明のDNAでコードされるタンパク質は、ペプチド生成酵素タンパク質である。ペプチド生成活性とは、カルボキシ成分とアミン成分とからペプチドを生成する活性のことをいう。以下、本発明のDNAでコードされる酵素の好ましい形態について、その性質面から説明する。

【0074】

本発明のDNAでコードされる酵素の好ましい形態として、ジペプチドの生成速度を1つの指標とした、下記のような能力を有する酵素が挙げられる。すな

わち、本発明の酵素の好ましい一形態として、カルボキシ成分とアミン成分とからペプチドを生成する能力を有し、下記(i)～(iv)の条件下におけるジペプチド合成反応において、L-アラニル-L-グルタミンの生成速度が、好ましくは0.03 mM/分以上、より好ましくは0.3 mM/分以上、特に好ましくは1.0 mM/分以上となる能力を有する酵素が挙げられる。ジペプチド合成反応の条件は次のとおりである。

(i)前記カルボキシ成分が、L-アラニンメチルエステル塩酸塩 (100 mM)

(ii)前記アミン成分が、L-グルタミン (200 mM)

(iii) pHが、9.0

(iv) (iv)酵素添加量が、タンパク量として0.61 mg/ml未満

【0075】

上記のような生成速度は、酵素を用いたペプチド合成のこれまでの常識を遙かに上回るものであり、本発明の酵素は極めて高速にペプチド合成を触媒する能力を有するものである。

【0076】

上記酵素添加量とは、反応系に添加する酵素の終末添加量を示し、タンパク量として0.01 mg/ml以上、好ましくは0.02 mg/ml以上の添加がのぞましい。「タンパク量として」とは、プロテインアッセイCBB溶液（ナカライ製）を用い、牛血清アルブミンを標準物質としたクマシーブリリアントブルーによる発色法で示した値を用いた。

【0077】

酵素活性の測定についてより具体的な例を挙げると、アミノ酸エステルとアミンを基質として含むホウ酸緩衝液中で反応させ、生成したペプチドを定量することにより測定できる。さらに具体的な例としては、L-アラニンメチルエステル 100 mM、L-グルタミン 200 mMを含む100 mMホウ酸緩衝液（pH 9.0）を用いて、25℃で数分反応させる方法が挙げられる。

【0078】

また、本発明のDNAでコードされる酵素として好ましいものの一形態には、カルボキシ成分として、アミノ酸エステル、アミノ酸アミドのいずれをも基質と

し得る性質を有する酵素が挙げられる。「アミノ酸エステル、アミノ酸アミドのいずれをも基質とし得る」というのは、アミノ酸エステルの少なくとも1種以上およびアミノ酸アミドの少なくとも1種以上を基質とし得ることを意味する。また、本発明の酵素として好ましいものの一形態には、アミン成分として、アミノ酸、C保護アミノ酸、アミンのいずれをも基質とし得る性質を有する酵素が挙げられる。「アミノ酸、C保護アミノ酸、アミンのいずれをも基質とし得る」というのは、アミノ酸の少なくとも1種以上、C保護アミノ酸の少なくとも1種以上、および、アミンの少なくとも1種以上を基質とし得ることを意味する。カルボキシ成分またはアミン成分について幅広い基質特異性を有することは、工業生産の場におけるコスト、生産設備などの点で都合のよい原料の選択性が広がるという点で好ましい。

【0079】

カルボキシ成分の具体例を挙げると、例えば、L-アミノ酸エステル、D-アミノ酸エステル、L-アミノ酸アミド、D-アミノ酸アミドなどが挙げられる。また、アミノ酸エステルには、天然型のアミノ酸に対応するアミノ酸エステルだけでなく、非天然型のアミノ酸もしくはその誘導体に対応するアミノ酸エステルもある。また、アミノ酸エステルとしては、 α -アミノ酸エステルの他、アミノ基の結合位置の異なる、 β -、 γ -、または、 ω -等のアミノ酸のエステルもある。アミノ酸エステルの代表例としては、アミノ酸のメチルエステル、エチルエステル、n-プロピルエステル、iso-プロピルエステル、n-ブチルエステル、iso-ブチルエステル、または、tert-ブチルエステルなどが挙げられる。

【0080】

アミン成分の具体例を挙げると、例えば、L-アミノ酸、C保護L-アミノ酸、D-アミノ酸、C保護D-アミノ酸、または、アミン等が例示される。また、アミンとしては、天然型アミンだけでなく、非天然型のアミンもしくはその誘導体なども例示される。また、アミノ酸としては、天然型アミノ酸だけではなく非天然型アミノ酸もしくはその誘導体も例示される。 α -アミノ酸の他、アミノ基の結合位置の異なる、 β -、 γ -、 ω -等のアミノ酸なども例示される。

【0081】

また、更に別の側面として、本発明のDNAでコードされる酵素として好ましいものの一形態には、ペプチド生成反応における触媒可能なpHの範囲が6.5～10.5の範囲である酵素が挙げられる。このように広いpH範囲で触媒可能であることは、様々な制約が生じ得る工業的生産において柔軟な対応が可能であるという点で好ましい。ただし、実際にペプチドを生産するにあたっては、酵素の触媒性能を最大限に引き出すように、取得された酵素に応じてさらに至適pHに調整して用いることが好ましい。

【0082】

また、更に別の側面として、本発明のDNAでコードされる酵素として好ましいものの一形態には、ペプチド生成反応における触媒可能な温度条件が0～60℃の範囲である酵素が挙げられる。このように広い温度範囲で触媒可能であることは、様々な制約が生じ得る工業的生産において柔軟な対応が可能であるという点で好ましい。ただし、実際にペプチドを生産するにあたっては、酵素の触媒性能を最大限に引き出すように、取得された酵素に応じてさらに至適温度に調整して用いることが好ましい。

【0083】

(6) ジペプチドの製造方法

本発明のジペプチドを製造する方法では、所定の酵素の存在下でカルボキシ成分とアミン成分とを反応させる。すなわち、本発明のジペプチドの製造方法は、カルボキシ成分とアミン成分とからペプチドを生成する能力を有する酵素または当該酵素を含む含有物を、カルボキシ成分とアミン成分とに作用させ、ジペプチドを合成せしめるものである。

【0084】

本発明に使用する酵素または酵素含有物を、カルボキシ成分とアミン成分に作用せしめる方法としては、当該酵素または酵素含有物、カルボキシ成分、およびアミン成分を混合すればよい。より具体的には、酵素または酵素含有物をカルボキシ成分とアミン成分を含む溶液中に添加して反応せしめる方法を用いてもよいし、当該酵素を生産する微生物を用いる場合には、当該酵素を生産する微生物を培養し、微生物中または微生物の培養液中に当該酵素を精製・蓄積せしめ、培養

液中にカルボキシ成分とアミン成分を添加する方法などを用いてもよい。生成されたジペプチドは、定法により回収し、必要に応じて精製することができる。

【0085】

「酵素含有物」とは、当該酵素を含有するものであればよく、具体的形態としては、当該酵素を生産する微生物の培養物、当該培養物から分離された微生物菌体、菌体処理物などが含まれる。微生物の培養物とは、微生物を培養して得られる物のことであり、より具体的には、微生物菌体、その微生物の培養に用いた培地および培養された微生物により生成された物質の混合物などのことをいう。また、微生物菌体は洗浄し、洗浄菌体として用いてもよい。また、菌体処理物には、菌体を破碎、溶菌、凍結乾燥したものなどが含まれ、さらに菌体などを処理して回収される粗酵素、さらに精製した精製酵素なども含まれる。精製処理された酵素としては、各種精製法によって得られる部分精製酵素等を使用してもよいし、これらを共有結合法、吸着法、包括法等によって固定化した固定化酵素を使用してもよい。また、使用する微生物によっては、培養中に一部、溶菌するものもあるので、この場合には培養液上清も酵素含有物として利用できる。

【0086】

また、当該酵素を含む微生物としては野生株を用いても良いし、本酵素を発現した遺伝子組換え株を用いてもよい。当該微生物としては、酵素微生物菌体に限らず、アセトン処理菌体、凍結乾燥菌体等の菌体処理物を使用してもよいし、これらを共有結合法、吸着法、包括法等によって固定化した固定化菌体、固定化菌体処理物を使用してもよい。

【0087】

なお、培養物、培養菌体、洗浄菌体、菌体を破碎あるいは溶菌させた菌体処理物を用いる場合には、ペプチドの生成に関与せずに生成ペプチドを分解する酵素が存在することが多く、この場合には、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) のような金属プロテアーゼ阻害剤を添加するほうが好ましい場合がある。添加量は、0.1 mM から 300 mM の範囲で、好ましくは 1 mM から 100 mM である。

【0088】

本発明のジペプチド製造方法の好ましい形態としては、上記（４－２）に記載した形質転換細胞を培地中で培養し、培地中および／または形質転換細胞中に、ペプチド生成酵素を蓄積させる方法が挙げられる。形質転換体を用いることにより、ペプチド生成酵素を簡便に大量生成できるため、ジペプチドの生成も大量に速く行うことができる。

【0089】

酵素または酵素含有物の使用量は、目的とする効果を発揮する量（有効量）であればよく、この有効量は当業者であれば簡単な予備実験により容易に求められるが、例えば酵素を用いる場合には、0.01から100ユニット（U）程度、洗浄菌体を用いる場合は1～500 g/L程度である。

【0090】

カルボキシ成分としては、もう一つの基質であるアミン成分と縮合してペプチドを生成できるものであれば、いかなるものを使用してよい。カルボキシ成分としては、例えば、L-アミノ酸エステル、D-アミノ酸エステル、L-アミノ酸アミド、D-アミノ酸アミド、更にはアミノ基の有さない有機酸エステル等が挙げられる。また、アミノ酸エステルとしては、天然型のアミノ酸に対応するアミノ酸エステルだけでなく、非天然型のアミノ酸もしくはその誘導体に対応するアミノ酸エステルなども例示される。また、アミノ酸エステルとしては、 α -アミノ酸エステルの他、アミノ基の結合位置の異なる、 β -、 γ -、 ω -等のアミノ酸のエステルなども例示される。アミノ酸エステルの代表例としては、アミノ酸のメチルエステル、エチルエステル、n-プロピルエステル、iso-プロピルエステル、n-ブチルエステル、iso-ブチルエステル、tert-ブチルエステル等が例示される。

【0091】

アミン成分としては、もう一つの基質であるカルボキシ成分と縮合してペプチドを生成できるものであれば、いかなるものも使用してよい。アミン成分としては、例えば、L-アミノ酸、C保護L-アミノ酸、D-アミノ酸、C保護D-アミノ酸、アミン等が挙げられる。また、アミンとしては、天然型アミンだけでなく、非天然型のアミンもしくはその誘導体などが例示される。また、アミノ酸とし

ては、天然型アミノ酸だけではなく非天然型アミノ酸もしくはその誘導体も例示される。 α -アミノ酸の他、アミノ基の結合位置の異なる、 β -、 γ -、 ω -等のアミノ酸なども例示される。

【0092】

出発原料であるカルボキシ成分およびアミン成分の濃度は各々 1 mM ~ 10 M、好ましくは 0.05 M ~ 2 M であるが、カルボキシ成分に対してアミン成分を等量以上添加したほうが好ましい場合がある。また、基質が高濃度だと反応を阻害するような場合には、反応中にこれらを阻害しない濃度にして逐次添加することができる。

【0093】

反応温度は 0 ~ 60 °C でペプチド合成可能であり、好ましくは 5 ~ 40 °C である。また反応 pH は pH 6.5 ~ 10.5 でペプチド合成可能であり、好ましくは pH 7.0 ~ 10.0 である。

【0094】

【実施例】

以下、実施例をあげて、さらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。生成物の測定には、薄層クロマトグラムのニンヒドリン発色での確認（定性）に加え、定量的には以下に示す高速液体クロマトグラフィーにて定量した。カラム：Inertsil ODS-2（GLサイエンス社製）、溶離液：5.0 mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウムを含むリン酸水溶液（pH 2.1）：メタノール = 100 : 15 ~ 50、流量：1.0 mL/min、検出 210 nm。

【0095】

（実施例 1）微生物の培養

1 L 中にグルコース 5 g、硫酸アンモニウム 5 g、リン酸一カリウム 1 g、リン酸二カリウム 3 g、硫酸マグネシウム 0.5 g、酵母エキス 10 g、ペプトン 10 g を含む培地（pH 6.2）50 mL を 500 mL 坂口フラスコに分注し、115 °C で 15 分殺菌した。これに同培地で 30 °C、16 時間培養したエンペドバクター ブレビス FERM BP-8113 株を 1 白金耳接種し、3

0℃、120往復/分で16時間振盪培養を行った。

【0096】

(実施例2) 微生物菌体を用いるペプチドの生産

実施例1で得られた培養液を遠心分離(10,000rpm, 15分)し菌体を集め、10mM EDTAを含む100mMホウ酸緩衝液(pH 9.0)に100g/Lになるように懸濁した。懸濁液1mLを、EDTA 10mMと下記のカルボキシ成分200mMと、下記のアミノ酸400mMを含む100mMホウ酸緩衝液(pH 9.0)1mLにそれぞれ添加し、全量を2mLとした後、18℃にて2時間反応をおこなった。この結果、生成したペプチドを表1に示した。

【0097】

【表1】

表1

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)	カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)
L-Ala-OMe	L-Leu	L-Ala-L-Leu	38.2	Gly-OMe	L-His	L-Gly-L-His	22.1
	L-Met	L-Ala-L-Met	68.3	L-Ser-OMe	L-Ser	L-Ser-L-Ser	29.0
	L-Phe	L-Ala-L-Phe	62.4	L-Val-OMe	L-Met	L-Val-L-Met	10.5
	L-Ser	L-Ala-L-Ser	51.3	L-Met-OMe	L-Phe	L-Met-L-Phe	28.5
	L-His	L-Ala-L-His	52.1	L-Thr-OMe	L-Leu	L-Thr-L-Leu	23.0
	L-Arg	L-Ala-L-Arg	72.1	L-Ile-OMe	L-Met	L-Ile-L-Met	8.3
	L-Gln	L-Ala-L-Gln	68.0				

(カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用)

【0098】

(実施例3) 酵素の精製

以下、遠心分離以降の操作は氷上あるいは4℃にて行った。実施例1と同様に、*Empedobacter brevis* FERM BP-8113を培養し、遠心分離(10,000rpm, 15分)によって菌体を集めた。菌体16gを50mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)にて洗浄後、同緩衝液40mLに懸濁し、195Wにて45分間超音波破碎処理を行った。この超音波破碎液を遠心分離(10,000rpm, 30分)し、破碎菌体片

を除去することにより超音波破碎液上清を得た。この超音波破碎液上清を 5 0 m M トリスー塩酸緩衝液 (p H 8 . 0) に対して一夜透析し、超遠心分離 (50,000 rpm, 30分) にて不溶性画分を除去することにより、上清液として可溶性画分を得た。得られた可溶性画分を トリスー塩酸緩衝液 (p H 8 . 0) にて予め平衡化した Q-Sepharose HP カラム (アマシャム社製) に供し、非吸着画分から活性画分を集めた。この活性画分を 5 0 m M 酢酸緩衝液 (p H 4 . 5) に対して一夜透析し、遠心分離 (10,000rpm, 30分) にて不溶性画分を除去することにより、上清液として透析画分を得た。この透析画分を 5 0 m M 酢酸緩衝液 (p H 4 . 5) で予め平衡化した Mono S カラム (アマシャム社製) に供し、0 ~ 1 M NaCl を含む同緩衝液の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。活性画分の内、夾雑タンパクの最も少ない一画分を 1 M NaCl を含む 5 0 m M 酢酸緩衝液 (p H 4 . 5) で予め平衡化した Superdex 200pg カラム (アマシャム社製) に供し、1 M NaCl を含む同緩衝液 (p H 4 . 5) を流すことによりゲル濾過を行い、活性画分溶液を得た。これらの操作により、本発明に使用されるペプチド生成酵素は電気泳動の実験結果より均一に精製されたことが確認された。上記の精製工程における活性の回収率は 1 2 . 2 %、精製度は 7 0 7 倍であった。

【0 0 9 9】

(実施例 4) 酵素の分子量測定

(S D S - ゲル電気泳動)

実施例 3 の方法により得られた精製酵素画分 0 . 3 μ g 相当をポリアクリルアミド電気泳動に供した。電気泳動緩衝液には 0 . 3 % (w / v) トリス、1 . 4 4 % (w / v) グリシン、0 . 1 % (w / v) ラウリル硫酸ナトリウムを、ポリアクリルアミドゲルはゲル濃度 1 0 ~ 2 0 % の濃度勾配ゲル (マルチゲル 1 0 - 2 0、第一化学薬品製)、分子量マーカーはファルマシア製分子量マーカーを用いた。電気泳動終了後、クーマシーブリリアントブルー R - 2 5 0 によってゲルを染色し、分子量約 7 5 k D a 位置に均一なバンドが検出された。

【0 1 0 0】

(ゲル濾過)

実施例 3 の方法により得られた精製酵素画分を 1 M NaCl を含む 5 0 m M 酢酸

緩衝液 (pH 4.5) で予め平衡化した Superdex 200pg カラム (アマシャム社製) に供し、1 M NaCl を含む同緩衝液 (pH 4.5) を流すことによりゲル濾過を行い、分子量を測定した。検量線を作成するための分子量既知の標準タンパクとしてはファルマシア製分子量マーカーを用いた。この結果、得られた酵素の分子量は約 150 kDa であった。

【0101】

SDS-ゲル電気泳動とゲル濾過の結果より、本酵素は分子量約 75 kDa のホモダイマーであることが示唆された。

【0102】

(実施例 5) 酵素の至適 pH

L-アラニンメチルエステル塩酸塩と L-グルタミンから L-アラニル-L-グルタミンを生成する反応における pH の影響を検討した。緩衝液としては、酢酸緩衝液 (pH 3.9~5.4) MES 緩衝液 (pH 5.4~6.4)、リン酸緩衝液 (pH 6.0~7.9) ホウ酸緩衝液 (pH 7.8~9.3)、CAPS 緩衝液 (pH 9.3~10.7)、および K_2HPO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 10.8~11.6) を用いた。100 mM L-アラニンメチルエステル、200 mM L-グルタミン、10 mM の EDTA を含む 100 mM のそれぞれの緩衝液 100 μ l に実施例 3 で得られた Mono S 画分酵素 (約 180 U/ml) を 1 μ l 加え、18℃、5 分間反応させ、反応に対する pH の影響を測定した。ホウ酸緩衝液 (pH 9.3) を用いた場合の活性を 100% とした結果を図 1 に示した。この結果、本酵素の至適 pH は 8~9.5 であった。

【0103】

(実施例 6) 酵素の至適温度

L-アラニンメチルエステル塩酸塩と L-グルタミンから L-アラニル-L-グルタミンを生成する反応における温度の影響を検討した。100 mM L-アラニンメチルエステル、200 mM L-グルタミン、10 mM EDTA を含む 100 mM のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 100 μ l に実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分を 1 μ l 加え、各温度にて 5 分間反応させ、反応に対する温度の影響を測定した。34℃での活性を 100% とした結果を図 2 に示した。この結果

、本酵素の至適温度は30～40℃であった。

【0104】

(実施例7) 酵素の阻害剤

L-アラニンメチルエステル塩酸塩とL-グルタミンを基質に用い、L-アラニル-L-グルタミン生成に与える阻害剤の影響を検討した。表2に示す10mMの各種酵素阻害剤を含む100mMのホウ酸緩衝液(pH9.0)50 μ lに実施例5で用いたものと同じ酵素画分2 μ lを加え、25℃にて5分間反応させた。尚、o-フェナンスロリン、フェニルメチルスルフォニルフルオリド、p-ニトロフェニル-p'-グアニジノベンゾエートについては50mMになるようにメタノールに溶解したものを使用した。各条件での酵素活性は酵素阻害剤を加えない条件でのL-アラニル-L-グルタミン生成を100とした場合の相対活性で示した。結果を表2に示す。この結果、本酵素は、セリン酵素阻害剤の内、フェニルメチルスルフォニルフルオリドでは阻害されないが、p-ニトロフェニル-p'-グアニジノベンゾエートで阻害される性質を示した。

【0105】

【表 2】

表 2

酵素阻害剤		L-Ala-L-Gln生成相対 活性 (%)
なし		100
金属酵素阻害剤	EDTA	96
	o-フェナンスロリン	96
SH酵素阻害剤	N-エチルマレイミド	110
	モノヨード酢酸	101
セリン酵素阻害剤	フェニルメチルスルフォニルフル オリド	115
	4-(2-アミノエチル)ベンゼンスル フォニルフルオリド	75
	p-ニトロフェニル p'-グアニジノベ ンゾエート	0.1

【0106】

(実施例 8) L-アラニンメチルエステルと L-グルタミンからの L-アラニル-L-グルタミンの生産

実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 3 μ l を、100 mM の L-アラニンメチルエステル塩酸塩、200 mM の L-グルタミン、10 mM の EDTA を含む 100 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、18℃にて反応した。この結果、図 3 に示すように、酵素添加区では、反応 60 分で 83 mM の L-アラニル-L-グルタミン (L-Ala-L-Gln) が生成し、副成する L-Ala-L-Ala-L-Gln は 1.3 mM であった。一方、酵素無添加区での L-Ala-L-Gln 生成はほとんど認められず、反応 120 分で 0.07 mM 程度であった。

【0107】

(実施例 9) L-アラニル-L-グルタミンの生産に与える L-グルタミン濃度の影響

実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 1 μ l を、100 mM の L-アラニンメ

チルエステル塩酸塩、表3に示す濃度のL-グルタミン、10mMのEDTAを含む100 μ lのホウ酸緩衝液(pH9.0)に加え、18℃にて2時間反応した。この結果を表3に示した。

【0108】

【表3】

表3

L-アラニンメチルエステル塩酸塩 (mM)	L-グルタミン (mM)	L-Ala-L-Gln (mM)
100	100	68.2
	110	72.1
	120	73.3
	130	75.1
	150	75.5
	200	82.0

【0109】

(実施例10) 酵素の基質特異性 (1)

カルボキシ成分としてL-アミノ酸エステルを用いた場合のエステル特異性を検討した。実施例5で用いたものと同じ酵素画分2 μ lを、表4に示す100mMのカルボキシ成分、200mM L-グルタミン、10mM EDTAを含む100 μ lのホウ酸緩衝液(pH9.0)に加え、25℃にて2時間反応した。この反応で生成したL-Ala-L-Gln量を表4に示した(表4中、HClは塩酸塩を示す)。

【0110】

【表 4】

表 4

カルボキシ成分	生成 L-Ala-L-Gln (mM)
L-アラニンメチルエステル・HCl	84.3
L-アラニンエチルエステル・HCl	91.5
L-アラニン- <i>t</i> -ブチルエステル・HCl	7.5

【0111】

(実施例 11) 酵素の基質特異性 (2)

カルボキシ成分に L-アラニンメチルエステル、アミン成分に各種の L-アミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、100 mM の L-アラニンメチルエステル塩酸塩、150 mM の表 5 に示す L-アミノ酸、10 mM の EDTA を含む 100 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、25℃にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 5 に示した (+印は、ペプチドの生成は確認されているが、標準品がなく定量できなかったもの、tr は微量を示す)。

【0112】

【表 5】

表 5

アミン成分	生成ペプチド (mM)		アミン成分	生成ペプチド (mM)	
Gly	L-Ala-Gly	13.7	L-Asn	L-Ala-L-Asn	65.5
L-Ala	L-Ala-L-Ala	25.4	L-Gln	L-Ala-L-Gln	79.3
L-Val	L-Ala-L-Val	20.8	L-Tyr	L-Ala-L-Tyr	17.6
L-Leu	L-Ala-L-Leu	45.3	L-CySH	L-Ala-L-CySH	+
L-Ile	L-Ala-L-Ile	33.9	L-Lys	L-Ala-L-Lys	71.8
L-Met	L-Ala-L-Met	83.3	L-Arg	L-Ala-L-Arg	88.0
L-Phe	L-Ala-L-Phe	74.4	L-His	L-Ala-L-His	66.9
L-Trp	L-Ala-L-Trp	53.9	L-Asp	L-Ala-L-Asp	2.1
L-Ser	L-Ala-L-Ser	62.5	L-Glu	L-Ala-L-Glu	42.9
L-Thr	L-Ala-L-Thr	53.9	L-Pro	L-Ala-L-Pro	tr

【0113】

(実施例 12) 酵素の基質特異性 (3)

カルボキシ成分に各種の L-アミノ酸メチルエステル、アミン成分に L-グルタミンを用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 6 に示す 100 mM の L-アミノ酸メチルエステル塩酸塩 (AA-OMe \cdot HCl)、150 mM の L-グルタミン、10 mM の EDTA を含む 100 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、25 $^{\circ}$ C にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 6 に示した (+印は、標準品がなく定量できなかったものの、生成は確認されているもの、tr は微量を示す)。尚、L-Trp-OMe、L-Tyr-OMe を用いた場合には、反応系に Tween-80 を終末 0.1 % になるように添加した。

【0114】

【表 6】

表 6

カルボキシ成分	生成ペプチド (mM)		カルボキシ成分	生成ペプチド (mM)	
Gly-OMe	Gly-L-Gln	54.7	L-Tyr-OMe	L-Tyr-L-Gln	3.4
L-Ala-OMe	L-Ala-L-Gln	74.6	CySH-OMe	L-CySH-L-Gln	+
L-Val-OMe	L-Val-L-Gln	15.4	L-Lys-OMe	L-Lys-L-Gln	+
L-Leu-OMe	L-Leu-L-Gln	+	L-Arg-OMe	L-Arg-L-Gln	7.1
L-Ile-OMe	L-Ile-L-Gln	8.4	L-His-OMe	L-His-L-Gln	+
L-Met-OMe	L-Met-L-Gln	12.0	L-Asp- α -OMe	α -L-Asp-L-Gln	tr
L-Phe-OMe	L-Phe-L-Gln	0.9	L-Asp- β -OMe	β -L-Asp-L-Gln	tr
L-Trp-OMe	L-Trp-L-Gln	+	L-Asp(OMe) ₂	L-Asp(OMe)-L-Gln	13.5
L-Ser-OMe	L-Ser-L-Gln	24.0	L-Glu- α -OMe	α -L-Glu-L-Gln	+
L-Thr-OMe	L-Thr-L-Gln	81.9	L-Glu- γ -OMe	γ -L-Glu-L-Gln	+
L-Asn-OMe	L-Asn-L-Gln	+	L-Pro-OMe	L-Pro-L-Gln	2.2
L-Gln-OMe	L-Gln-L-Gln	0.3			

(カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用)

【0115】

(実施例 13) 酵素の基質特異性 (4)

カルボキシ成分に各種の L-アミノ酸メチルエステル、アミン成分に各種の L-アミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 7 に示す 100 mM の L-アミノ酸メチルエステル塩酸塩 (AA-OMe \cdot HCl)、表 7 に示す 150 mM の各種 L-アミノ酸、10 mM の EDTA を含む 100 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、25℃にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 7 に示した (tr は微量を示す)。尚、L-Trp-OMe を用いた場合には、反応系に Tween-80 を終末 0.1% になるように添加した (+印は、標準品がなく定量できなかったものの、生成が確認されているものを示す)。

【0116】

【表 7】

表 7

カルボキシ 成分	アミン 成分	生成ペプチド (mM)		カルボキシ 成分	アミン 成分	生成ペプチド (mM)	
Gly-OMe	L-CySH	Gly-L-CySH	45.6	L-Met-OMe	L-Ser	L-Met-L-Ser	12.8
	L-Arg	Gly-L-Arg	25.5		L-Met	L-Met-L-Met	25.0
	L-Phe	Gly-L-Phe	44.0		L-Phe	L-Met-L-Phe	34.0
	L-His	Gly-L-His	31.6	L-Ile-OMe	L-Ser	L-Ile-L-Ser	17.2
	L-Lys	Gly-L-Lys	9.8		L-Met	L-Ile-L-Met	10.0
	L-Ser	Gly-L-Ser	44.2		L-Phe	L-Ile-L-Phe	5.2
L-Thr-OMe	Gly	L-Thr-Gly	9.4	L-Arg-OMe	L-Ser	L-Arg-L-Ser	3.6
	L-Ala	L-Thr-L-Ala	9.4		L-Met	L-Arg-L-Met	0.7
	L-Val	L-Thr-L-Val	0.7		L-Phe	L-Arg-L-Phe	1.9
	L-Leu	L-Thr-L-Leu	28.4	L-Leu-OMe	L-Met	L-Leu-L-Met	12.2
	L-Met	L-Thr-L-Met	38.6	L-Trp-OMe	L-Met	L-Trp-L-Met	4.1
	L-Ser	L-Thr-L-Ser	58.2	L-Lys-OMe	L-Met	L-Lys-L-Met	6.8
L-Ser-OMe	L-Ser	L-Ser-L-Ser	38.0	L-His-OMe	L-Met	L-His-L-Met	6.5
	L-Met	L-Ser-L-Met	12.5	L-Asn-OMe	L-Glu	L-Asn-L-Glu	10.2
	L-Phe	L-Ser-L-Phe	20.3				
L-Val-OMe	L-Ser	L-Val-L-Ser	30.8				
	L-Met	L-Val-L-Met	10.3				
	L-Phe	L-Val-L-Phe	6.1				

(カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用)

【0117】

(実施例 14) 酵素の基質特異性 (5)

カルボキシ成分に各種の L-または D-体のアミノ酸メチルエステル、アミン成分に各種の L-または D-体のアミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 8 に示す 100 mM のアミノ酸メチルエステル塩酸塩 (AA-OMe \cdot HCl)、表 8 に示す 150 mM の各種アミノ酸、10 mM の EDTA を含む 100 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に

加え、25℃にて3時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表8に示した(trは微量を示す)。

【0118】

【表8】

表8

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド (mM)	
D-Ala-OMe	L-Gln	D-Ala-L-Gln	69.3
D-Ala-OMe	L-Ser	D-Ala-L-Ser	20.3
D-Thr-OMe		D-Thr-L-Ser	1.0
D-Ser-OMe		D-Ser-L-Ser	3.3
D-Val-OMe		D-Val-L-Ser	0.6
D-Met-OMe		D-Met-L-Ser	5.1
L-Ala-OMe	D-Gln	L-Ala-D-Gln	0.3
L-Ala-OMe	D-Ser	L-Ala-D-Ser	5.4
L-Thr-OMe		L-Thr-D-Ser	6.9
L-Ser-OMe		L-Ser-D-Ser	16.2
L-Val-OMe		L-Val-D-Ser	1.4
L-Met-OMe		L-Met-D-Ser	1.9
D-Ala-OMe	D-Gln	D-Ala-D-Gln	tr
D-Ala-OMe	D-Ser	D-Ala-D-Ser	0.2
D-Thr-OMe		D-Thr-D-Ser	1.1
D-Ser-OMe		D-Ser-D-Ser	2.5
D-Val-OMe		D-Val-D-Ser	0.5
D-Met-OMe		D-Met-D-Ser	2.7

(カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用)

【0119】

(実施例15) 酵素の基質特異性 (6)

カルボキシ成分に各種のL-アミノ酸アミド、アミン成分に各種のL-アミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例5で用いたものと同じ酵素画分2 μ lを、表9に示す100mMのL-アミノ酸アミド(AA-NH₂·HCl)、表

9に示す150 mMのL-アミノ酸、10 mMのEDTAを含む100 μ lのホウ酸緩衝液（pH 9.0）に加え、25℃にて3時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表9に示した。

【0120】

【表9】

表9

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド (mM)	
L-Phe-NH ₂	L-Gln	L-Phe-L-Gln	0.2
L-Phe-NH ₂	L-Ser	L-Phe-L-Ser	0.6
L-Ala-NH ₂	L-Gln	L-Ala-L-Gln	7.6
L-Ala-NH ₂	L-Met	L-Ala-L-Met	3.4
L-Ala-NH ₂	L-His	L-Ala-L-His	3.9
L-Thr-NH ₂	L-Gln	L-Thr-L-Gln	0.3

【0121】

（実施例16）酵素の基質特異性（7）

カルボキシ成分に各種のL-アラニンメチルエステル、アミン成分にC保護L-アミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例5で用いたものと同じ酵素画分2 μ lを、表10に示す100 mMのL-アミノ酸メチルエステル（AA-OMe·HCl）、表10に示す150 mMのL-アミノ酸アミド、10 mMのEDTAを含む100 μ lのホウ酸緩衝液（pH 9.0）に加え、25℃にて3時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表10に示した。

【0122】

【表 10】

表 10

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド (mM)	
L-Ala-OMe	Gly-NH ₂	L-Ala-Gly-NH ₂	7.4
	L-Ala-NH ₂	L-Ala-L-Ala-NH ₂	8.3
	L-Phe-NH ₂	L-Ala-L-Phe-NH ₂	12.2

【0123】

(実施例 17) 酵素の基質特異性 (8)

カルボキシ成分に各種のアミノ酸メチルエステル、アミン成分にメチルアミンを用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 11 に示す 100 mM のアミノ酸メチルエステル (AA-OMe \cdot HCl)、表 11 に示す 150 mM のメチルアミン、10 mM の EDTA を含む 100 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、25 $^{\circ}$ C にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 11 に示した。

【0124】

【表 11】

表 11

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド (mM)	
Gly-OMe	メチルアミン	Gly-メチルアミン	1.1
L-Thr-OMe		L-Thr-メチルアミン	0.2
L-Ala-OMe		L-Ala-メチルアミン	0.3

【0125】

(実施例 18) 酵素の基質特異性 (9)

カルボキシ成分として β -アミノ酸エステル、あるいはアミン成分として β -アミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 12 に示す 100 mM のカルボキシ成分、表 12 に示す 150 mM のアミン成分、10 mM の EDTA を含む 100 μ l のホウ酸緩衝液 (p

H 9. 0) に加え、25℃にて3時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表12に示した(trは微量を示す)。

【0126】

【表12】

表12

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)
Gly-OMe	β -Ala	Gly- β -Ala	2.2
Gly-OMe	β -Phe	Gly- β -Phe	0.4
L-Ala-OMe	β -Ala	Ala- β -Ala	7.7
L-Ala-OMe	β -Phe	Ala- β -Phe	1.4
L-Thr-OMe	β -Ala	Thr- β -Ala	3.2
L-Thr-OMe	β -Phe	Thr- β -Phe	1.4
β -Ala-OMe	L- α -Ala	β -Ala-L- α -Ala	tr
β -Ala-OMe	β -Ala	β -Ala- β -Ala	0.2
β -Ala-OMe	L-Gln	β -Ala-L-Gln	0.6
β -Ala-OMe	L-Ser	β -Ala-L-Ser	3.2

【0127】

(実施例19) 酵素の基質特異性 (10)

カルボキシ成分としてL-アミノ酸エステル、アミン成分としてペプチドを用いた場合のオリゴペプチド生産を検討した。実施例5で用いたものと同じ酵素画分2 μ lを、表13に示す100mMのカルボキシ成分、表13に示す150mMのアミン成分、10mMのEDTAを含む100 μ lのホウ酸緩衝液(pH9.0)に加え、25℃にて3時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表13に示した。この結果、本酵素はジペプチド生産のみならず、アミン成分としてペプチドを用いることにより、鎖長の長いペプチドも生産できることが明らかとなった。

【0128】

以上実施例9～20に示されるように、エンペドバクター プレビス FER M BP-8113株から得られた本酵素が、極めて基質特異性の広い酵素であることが

判明した。

【0129】

【表13】

表13

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)
L-Ala-OMe	L-Ala	L-Ala-L-Ala	28.7
	L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala	57.5
	L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	44.5
	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	34.8
	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	1.4*
	L-Ala-L-Gln	L-Ala-L-Ala-L-Gln	15.2
	Gly-L-Ala	L-Ala-Gly-L-Ala	25.9
	Gly-Gly	L-Ala-Gly-Gly	41.7
	L-His-L-Ala	L-Ala-L-His-L-Ala	55.9
	L-Leu-L-Ala	L-Ala-L-Leu-L-Ala	48.3
	L-Phe-L-Ala	L-Ala-L-Phe-L-Ala	49.7
	L-Phe-Gly	L-Ala-L-Phe-Gly	43.7
Gly-OMe	L-Ala-L-Tyr	Gly-L-Ala-L-Tyr	1.7
	Gly-L-Gln	Gly-Gly-L-Gln	7.2
	Gly-L-Tyr-L-Ala	Gly-Gly-L-Tyr-L-Ala	44.2
L-Thr-OMe	Gly-Gly	L-Thr-Gly-Gly	83.0

(* L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala の溶解度が低かったため、この系ではカルボキシ成分 10 mM、アミン成分 15 mM の濃度を用いた。他の条件は実施例の説明と同じ)

【0130】

(実施例 20) 既存酵素とのペプチド合成触媒能力の比較

本酵素のペプチド合成能力を既存酵素と比較した。既存酵素としては、EP 278

787A1記載のカルボキシペプチダーゼY、EP 359399B1記載のチオールエンドペプチダーゼ（フィシン、パパイン、ブロメライン、キモパパイン）を用い、これらについては、シグマ社製の精製酵素を使用した。本酵素源としては実施例3で均一に精製した酵素を使用した。これら酵素は、タンパク量として表14に示す量を反応系に添加した。反応は、100mM L-アラニンメチルエステルと200mM L-グルタミンを含む100 μ lのホウ酸緩衝液（pH9.0）に加え、25℃にて反応した。尚、カルボキシペプチダーゼは、1mMのEDTAを含む10mM酢酸緩衝液（pH5.0）で溶解した酵素、チオールエンドペプチダーゼは、2mM EDTA、0.1M KCl、5mM ジチオスレイトールを含む10mM酢酸緩衝液（pH5.0）で溶解した酵素を用いた。これら酵素によるL-アラニル-L-グルタミンの生成速度比を表14に示した。尚、本酵素の分子量は75000のダイマーであるのに対し、カルボキシペプチダーゼYの分子量は約61000、上記チオールエンドペプチダーゼの分子量は約23000～36000と報告されているので、分子量当たりのL-アラニル-L-グルタミン生成速度は、実施例に示した単位重量当たりよりも更に本酵素の方が速くなる。

【0131】

この結果、酵素無添加でも、ごく微量のL-アラニル-L-グルタミン生成が観察され、カルボキシペプチダーゼあるいはチオールエンドペプチダーゼ添加区では、酵素無添加区に比し若干生成速度速まることが観察された。これに対して、本酵素の添加区では圧倒的に速いL-アラニル-L-グルタミン生成速度が観察され、その速度は、カルボキシペプチダーゼY、チオールエンドペプチダーゼに対して、約5,000倍～100,000倍であった。以上のように、本酵素は、今までに例のない極めて速いペプチド生成速度を有していることが判明した。

【0132】

【表 14】

表 14

酵素	添加酵素量 (タンパク mg/ml)	L-Ala-L-Gln 生成 速度 (mM/分)	酵素単位重量当 たりの L-Ala-L-Gln 生成速度比
酵素なし	0	0.0006	
カルボキシペプチ ダーゼ Y	0.61	0.0257	0.0191
フィシン	2.60	0.0096	0.0017
パパイン	2.30	0.0106	0.0021
ブロメライン	2.80	0.0062	0.0010
キモパパイン	3.60	0.0100	0.0013
本発明酵素	0.02	4.4000	100.0

【0133】

(実施例 21) エンペドバクター ブレビス由来のペプチド生成酵素遺伝子の単離

以下、ペプチド生成酵素遺伝子の単離について述べるが、微生物はエンペドバクター ブレビス FERM BP-8113を用いた。遺伝子の単離にはエシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM-109を宿主に用い、ベクターはpUC118を用いた。

【0134】

(1) 決定内部アミノ酸配列に基づいたPCRプライマーの作製

前述のエンペドバクター ブレビス FERM BP-8113株由来のペプチド生成酵素のリジルエンドペプチダーゼによる消化物をエドマン分解法により決定したアミノ酸配列(配列番号1及び2)をもとに、配列番号3及び4にそれぞれ示す塩基配列を有するミックスプライマーを作成した。

【0135】

(2) 菌体の取得

エンペドバクター ブレビス FERM BP-8113株をCM2G寒天培地(50 g/l グルコース、10 g/l 酵母エキス、10 g/l ペプトン、5 g/l

1 塩化ナトリウム、20 g/l 寒天、pH 7.0)) 上で30℃、24時間培養した。この菌体を、50 ml のCM2 G液体培地(上記培地より寒天を除いた培地)を張り込んだ500 ml の坂口フラスコに1白金耳植菌し、30℃で振盪培養した。

【0136】

(3) 菌体からの染色体DNAの取得

培養液50mlを遠心分離(12,000 rpm、4℃、15分間)し、集菌した。QIAGEN Genomic-tip System (Qiagen社)を用いて、説明書の方法に基づき、この菌体から染色体DNAを取得した。

【0137】

(4) PCR法によるペプチド生成酵素遺伝子の一部を含むDNA断片の取得
エンペドバクター ブレビス FERM BP-8113株由来のペプチド生成酵素遺伝子の一部を含むDNA断片を、LA-Taq (宝酒造社製)を用いたPCR法により取得した。エンペドバクター ブレビス FERM BP-8113株から取得した染色体DNAに対し、配列番号3及び4に示す塩基配列を有するプライマーを使用してPCR反応を行った。

【0138】

PCR反応は、Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL (宝酒造製)を用いて行い、以下の条件の反応を30サイクル行った。

94℃ 30秒

52℃ 1分

72℃ 1分

反応後、反応液3 µlを0.8%アガロース電気泳動に供した。その結果、約1.5 kbのDNA断片が増幅されていることが確認された。

【0139】

(5) 遺伝子ライブラリーからのペプチド生成酵素遺伝子のクローニング

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、まず、上記PCRにおいて増幅されたDNA断片をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。サザンハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd editi

on, Cold Spring Harbor press(1989)に説明されている。

【0140】

上記PCRで増幅された約1.5 kb DNA断片を、0.8%アガロース電気泳動により分離した。目的のバンドを切り出し、精製した。このDNA断片をDIG High Prime (ベーリンガー・マンハイム社製)を使用して、説明書に基づきプローブのジゴキシニゲンによる標識を行った。

【0141】

本実施例21(3)で取得したエンペドバクター ブレビスの染色体DNAを制限酵素HindIIIで37℃、16時間反応させて完全に消化した後、0.8%アガロースゲルで電気泳動した。電気泳動後のアガロースゲルからナイロンメンブレンフィルターNylon membranes positively charged (ロシュ・ダイアグノティクス社製)にブロッティングし、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEASY HYB (ベーリンガー・マンハイム社製)を用いて行った。フィルターを50℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記で作製した、ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、50℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1% SDSを含む2×SSCで室温、20分間洗浄した。さらに0.1% SDSを含む0.1×SSCで65℃、15分間洗浄を2回行った。

【0142】

プローブとハイブリダイズするバンドの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製)を使用して、説明書に基づき行った。その結果、プローブとハイブリダイズする約4 kbのバンドが検出できた。

【0143】

本実施例21(3)で調製した染色体DNA 5 µgをHindIIIで完全に消化した。0.8%アガロースゲル電気泳動により約4 kbのDNAを分離し、Gene Clean II Kit (フナコシ社製)を用いてDNAを精製し、10 µlのTEに溶解した。このうち4 µlと、pUC118 HindIII/BAP (宝酒造製)とを混合し、DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造製)を用いて連結反応を行った。このライゲーション反応液5 µlとEscherichia coli JM109のコンピテント・セル (東洋紡績製) 1

00 μ lとを混合して、Escherichia coliを形質転換した。これを適当な固形培地に塗布し、染色体DNAライブラリーを作製した。

【0144】

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、上記プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによる染色体DNAライブラリーのスクリーニングを行った。コロニーハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press(1989)に説明されている。

【0145】

染色体DNAライブラリーのコロニーをナイロンメンブレンフィルターNylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization (ロシュ・ダイアグノティクス社製)に移し、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEASY HYB (ベーリンガー・マンハイム社製)を用いて行った。フィルターを37℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、50℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1% SDSを含む2×SSCで室温、20分間洗浄した。さらに0.1% SDSを含む0.1×SSCで65℃、15分間洗浄を2回行った。

【0146】

標識プローブとハイブリダイズするコロニーの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製)を使用して、説明書に基づき行った。その結果、標識プローブとハイブリダイズするコロニーを2株確認できた。

【0147】

(6) エンベドバクター ブレビス由来ペプチド生成酵素遺伝子の塩基配列
標識プローブとハイブリダイズしたことが確認された上記2菌株から、エシェリヒア コリ JM109が保有するプラスミドを、Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (プロメガ社製)を用いて調製し、プローブとハイブリダイズした近傍の塩基配列を決定した。シーケンス反応はCEQ DTCS-Quick Start Kit (ベックマン・コールター社製)を用いて、説明書に基づき行った。また、電気泳動はCEQ 2000-XL (ベックマン・コールター社製)を用いて行った。

【0148】

その結果、ペプチド生成酵素の内部アミノ酸配列（配列番号1及び2）を含むタンパク質をコードするオープンリーディングフレームが存在し、ペプチド生成酵素をコードする遺伝子であることを確認した。ペプチド生成酵素遺伝子全長の塩基配列とこれに対応するアミノ酸配列を配列表配列番号5に示した。得られたオープンリーディングフレームをBLASTPプログラムで相同性解析した結果、二つの酵素に相同性が見出され、*Acetobacter pasteurianus*の α -アミノ酸エステルハイドrolラーゼ (Appl. Environ. Microbiol., 68(1), 211-218(2002)) とは、アミノ酸配列で34%、*Brevibacillus laterosporum* (J. Bacteriol., 173(24), 7848-7855(1991)) のグルタリル-7ACAアシラーゼとは、アミノ酸配列で26%の相同性を示した。

【0149】

（実施例22）エンペドバクター属由来のペプチド生成酵素遺伝子の大腸菌における発現

エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) W3110染色体DNA上のE. coli JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中からE. coli

JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを有する株を選択し、このプラスミドをpTrpTと命名した。

【0150】

エンペドバクター ブレビスFERM BP-8113の染色体DNAを鋳型として配列番号9、10に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRにより目的遺伝子を増幅した。このDNA断片をNdeI/PstIにて処理し、得られたDNA断片とpTrpTのNdeI/PstI処理物をライゲーションした。このライゲーション溶液でエシェリヒア コリ JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを有する株を選択し、このプラスミドをpTrpT_Gtg2と命名した。

【0151】

pTrpT_Gtg2を有するエシェリヒア コリ JM109を100mg/lアンピシリンを含むLB培地で、30℃、24時間シード培養した。得られた培養液1mlを、50mlの培地（2g/lD-グルコース、10g/l酵母エキス、10g/lカザミノ酸、5g/l硫酸アンモニウム、3g/lリン酸二水素カリウム、1g/lリン酸水素二カリウム、0.5g/l硫酸マグネシウム七水和物、100mg/lアンピシリン）を張り込んだ500ml坂口フラスコにシードし、25℃、24時間の本培養を行った。培養液1mlあたり0.44UのL-アラニル-L-グルタミン生成活性を有しており、クローニングした遺伝子がE. coliで発現したことを確認した。なお、対照としてpTrpTのみを導入した形質転換体には、活性は検出されなかった。

【0152】

（シグナル配列予測）

配列表に記載の配列番号6番のアミノ酸配列をSignalP v1.1プログラム（Protein Engineering, vol12, no.1, pp.3-9, 1999）にて解析したところ、アミノ酸配列の1-22番目までがシグナルとして機能してペリプラズムに分泌すると予測され、成熟タンパクは23番目より下流であると推定された。

【0153】

（分泌の確認）

p T r p T _Gtg2 を有するエシェリヒア コリ J M 1 0 9 を 1 0 0 m g / l アンピシリンを含むLB培地で、30℃、24時間シード培養した。得られた培養液 1 m l を、5 0 m l の培地 (2 g / l グルコース、10 g / l 酵母エキス、1 0 g / l カザミノ酸、5 g / l 硫酸アンモニウム、3 g / l リン酸二水素カリウム、1 g / l リン酸水素二カリウム、0. 5 g / l 硫酸マグネシウム七水和物、1 0 0 m g / l アンピシリン) を張り込んだ5 0 0 m l 坂口フラスコにシードし、25℃、24時間の本培養を行い培養菌体を得た。

【0154】

上記培養菌体を 2 0 g / d l のスクロース溶液を用いた浸透圧ショック法により、ペリプラズム画分とサイトプラズム画分に分画した。2 0 g / d l のスクロース溶液に浸した菌体を 5 m M MgSO₄ 水溶液に浸し、この遠心上清をペリプラズム画分 (Pe) とした。また、その遠心沈殿を再懸濁し、超音波破碎したものをサイトプラズム画分 (Cy) とした。サイトプラズムを分離したことを確認するために、サイトプラズムに存在することが知られているグルコース 6 燐酸デヒドロゲナーゼの活性を指標とした。測定法は 1 m M グルコース 6 燐酸、0. 4 m M NADP、1 0 m M MgSO₄、50 m M Tris-Cl (p H 8)、30℃の反応溶液の中に適当量の酵素を添加し、340 n m の吸光度の測定により NADPH の生成を測定することにより行った。

【0155】

別途調整した無細胞抽出液の活性を 1 0 0 % としたときの、サイトプラズム画分、ペリプラズム画分の酵素量を図 4 に示す。グルコース 6 燐酸デヒドロゲナーゼ活性がペリプラズム画分に混入していないことは、サイトプラズム画分にペリプラズム画分が混入していないことを示す。Ala-Gln 生成活性のうち約 60% がペリプラズム画分に回収され、上記 S i g n a l P v l . 1 プログラムを用いてアミノ酸配列から予測されたように、Ala-Gln 生成酵素がペリプラズムに分泌していることが確認された。

【0156】

(実施例 23) スフィンゴバクテリウム エスピー の菌体を用いる L -アラニル-L-グルタミンの生産

スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株の培養には、1 L中にグルコース 5 g、硫酸アンモニウム 5 g、リン酸一カリウム 1 g、リン酸二カリウム 3 g、硫酸マグネシウム 0.5 g、酵母エキス 10 g、ペプトン 10 gを含む培地 (pH 7.0) 50 mLを500 mL坂口フラスコに分注し、115℃で15分殺菌したものを用いた。これに1 L中にグルコース 5 g、酵母エキス 10 g、ペプトン 10 g、NaCl 5 gを含む斜面寒天培地 (寒天 20 g/L、pH 7.0) にて30℃、24時間培養したスフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株を1白金耳接種し、30℃、120往復/分、で20時間振とう培養を行った。この培養液1 mLを上記培地 (50 mL/500 mL坂口フラスコ) に添加し、30℃、18時間培養した。培養終了後、これらの培養液から菌体を遠心分離し、湿菌体として100 g/Lになるように10 mMのEDTAを含む0.1 Mホウ酸緩衝液 (pH 9.0) にて懸濁した。この菌体懸濁液0.1 mLに、EDTA 10 mM、L-アラニンメチルエステル塩酸塩 200 mM、及びL-グルタミン 400 mMを含む100 mMホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 0.1 mLを添加し、全量を0.2 mLとした後、25℃にて120分反応をおこなった。このときのL-アラニル-L-グルタミン) の生成量は62 mMであった。

【0157】

(実施例 24) スフィンゴバクテリウム エスピーからの酵素の精製

以下、遠心分離以降の操作は氷上あるいは4℃にて行った。実施例 23と同様に、スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株を培養し、遠心分離 (10,000 rpm, 15分) によって菌体を集めた。菌体2 gを20 mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) にて洗浄後、同緩衝液8 mLに懸濁し、19.5 Wにて45分間超音波破碎処理を行った。この超音波破碎液を遠心分離 (10,000 rpm, 30分) し、破碎菌体片を除去することにより超音波破碎液上清を得た。この超音波破碎液上清を20 mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) に対して一夜透析し、超遠心分離 (50,000 rpm, 30分) にて不溶性画分を除去することにより、上清液として可溶性画分を得た。得られた可溶性画分をトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) にて予め平衡化したQ-Sepharose HPカラム (アマシャム社製

）に供し、非吸着画分から活性画分を集めた。この活性画分を 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に対して一夜透析し、遠心分離 (10,000 rpm, 30 分) にて不溶性画分を除去することにより、上清液として透析画分を得た。この透析画分を 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で予め平衡化した SP-Sepharose HP カラム (アマシャム社製) に供し、0 ~ 1 M NaCl を含む同緩衝液の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた活性画分を得た。

【0158】

(実施例 25) 酵素画分を用いた L-アラニル-L-グルタミンの生産

実施例 24 で精製した SP-Sepharose HP 画分 (約 27 U/ml) 10 μ l を、11 mM の L-アラニンメチルエステル塩酸塩、222 mM の L-グルタミン、11 mM の EDTA を含む 90 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、25 $^{\circ}$ C にて 120 分反応した。この結果、酵素添加区では、73 mM の L-アラニル-L-グルタミンが生成した。一方、酵素無添加区での L-Ala-L-Gln 生成はほとんど認められず、反応 120 分で 0.07 mM 程度であった。

【0159】

(実施例 26) スフィンゴバクテリウム エスピー由来のペプチド生成酵素遺伝子の単離

以下、ペプチド生成酵素遺伝子の単離について述べるが、微生物はスフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124 株を用いた。遺伝子の単離にはエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 α を宿主に用い、ベクターは pUC118 を用いた。

【0160】

(1) 菌体の取得

スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124 株を CM2G 寒天培地 (50 g/l グルコース、10 g/l 酵母エキス、10 g/l ペプトン、5 g/l 塩化ナトリウム、20 g/l 寒天, pH 7.0) 上で 25 $^{\circ}$ C、24 時間培養した。この菌体を、50 ml の CM2G 液体培地 (上記培地より寒天を除いた培地) を張り込んだ 500 ml の坂口フラスコに 1 白金耳植菌し、25 $^{\circ}$ C で振盪培養した。

【0161】

(2) 菌体からの染色体DNAの取得

培養液 50 ml を遠心分離 (12,000 rpm、4℃、15 分間) し、集菌した。QIAGEN Genomic-tip System (Qiagen 社) を用いて、説明書の方法に基づき、この菌体から染色体 DNA を取得した。

【0162】

(3) PCR 法によるプローブ用 DNA 断片の取得

エンペドバクター ブレビス FERM BP-8113 株由来のペプチド生成酵素遺伝子の一部を含む DNA 断片を、LA-Taq (宝酒造社製) を用いた PCR 法により取得した。エンペドバクター ブレビス FERM BP-8113 株から取得した染色体 DNA に対し、配列番号 3 及び 4 に示す塩基配列を有するプライマーを使用して PCR 反応を行った。

【0163】

PCR 反応は、Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL (宝酒造製) を用いて行い、以下の条件の反応を 30 サイクル行った。

94℃ 30 秒

52℃ 1 分

72℃ 1 分

反応後、反応液 3 μ l を 0.8% アガロース電気泳動に供した。その結果、約 1.5 kb の DNA 断片が増幅されていることが確認された。

【0164】

(4) 遺伝子ライブラリーからのペプチド生成酵素遺伝子のクローニング

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、まず、上記 PCR において増幅された DNA 断片をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。サザンハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989) に説明されている。

【0165】

上記 PCR で増幅された約 1.5 kb DNA 断片を、0.8% アガロース電気泳動により分離した。目的のバンドを切り出し、精製した。この DNA 断片を DI

G High Prime (ベーリンガー・マンハイム社製) を使用して、説明書に基づきプローブのジゴキシニゲンによる標識を行った。

【0166】

本実施例 23 (2) で取得したスフィンゴバクテリウム エスピーの染色体 DNA を制限酵素 SacI で 37℃、16 時間反応させて完全に消化した後、0.8% アガロースゲルで電気泳動した。電気泳動後のアガロースゲルからナイロンメンブレンフィルター Nylon membranes positively charged (ロシュ・ダイアグノティクス社製) にブロッティングし、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションは EASY HYB (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて行った。フィルターを 37℃ で 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記で作製した、ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、37℃ で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを 0.1% SDS を含む 1×SSC で 60℃ で洗浄を 2 回行った。

【0167】

プローブとハイブリダイズするバンドの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製) を使用して、説明書に基づき行った。その結果、プローブとハイブリダイズする約 3 kb のバンドが検出できた。

【0168】

本実施例 23 (2) で調製した染色体 DNA 5 μ g を SacI で完全に消化した。0.8% アガロースゲル電気泳動により約 3 kb の DNA を分離し、Gene Clean II Kit (フナコシ社製) を用いて DNA を精製し、10 μ l の TE に溶解した。このうち 4 μ l と、SacI で 37℃、16 時間反応させて完全に消化した後、Alkaline Phosphatase (E.coli C75) で 37℃、30 分、50℃、30 分処理した pUC118 とを混合し、DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造製) を用いて連結反応を行った。このライゲーション反応液 5 μ l と Escherichia coli DH5 α のコンピテント・セル (宝酒造社製) 100 μ l とを混合して、Escherichia coli を形質転換した。これを適当な固形培地に塗布し、染色体 DNA ライブラリーを作製した。

【0169】

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、上記プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによる染色体DNAライブラリーのスクリーニングを行った。コロニーハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press(1989)に説明されている。

【0170】

染色体DNAライブラリーのコロニーをナイロンメンブレンフィルターNylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization (ロシュ・ダイアグノティクス社製)に移し、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEASY HYB (ベーリンガー・マンハイム社製)を用いて行った。フィルターを37℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、37℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1% SDSを含む1×SSCで60℃で洗浄を2回行った。

【0171】

標識プローブとハイブリダイズするコロニーの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製)を使用して、説明書に基づき行った。その結果、標識プローブとハイブリダイズするコロニーを6株確認できた。

【0172】

(5) スフィンゴバクテリウム エスピー由来ペプチド生成酵素遺伝子の塩基配列

標識プローブとハイブリダイズしたことが確認された上記6菌株から、エシェリヒア コリ DH5 α が保有するプラスミドを、Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (プロメガ社製)を用いて調製し、プローブとハイブリダイズした近傍の塩基配列を決定した。シーケンス反応はCEQ DTCS-Quick Start Kit (ベックマン・コールター社製)を用いて、説明書に基づき行った。また、電気泳動はCEQ 2000-XL (ベックマン・コールター社製)を用いて行った。

【0173】

その結果、ペプチド生成酵素をコードするオープンリーディングフレームが存在した。スフィンゴバクテリウム エスピー由来ペプチド生成酵素遺伝子全長の

塩基配列とこれに対応するアミノ酸配列を配列表配列番号 11 に示した。スフィンゴバクテリウム エスピー由来ペプチド生成酵素は、エンペドバクターブレビス由来ペプチド生成酵素とアミノ酸配列で 63.5% の相同性を示した (BLAST プログラムを使用)。

【0174】

(実施例 27) スフィンゴバクテリウム属由来のペプチド生成酵素遺伝子の大腸菌における発現

スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124 の染色体 DNA を鋳型として配列番号 13、14 に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR により目的遺伝子を増幅した。この DNA 断片を Nde I/Xba I にて処理し、得られた DNA 断片と pTrpT の Nde I/Xba I 処理物をライゲーションした。このライゲーション溶液でエシェリヒア コリ JM109 を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを有する株を選択し、このプラスミドを pTrpT_Sm_aet と命名した。

【0175】

pTrpT_Sm_aet を有するエシェリヒア コリ JM109 を 3 ml の培地 (2 g/l グルコース、10 g/l 酵母エキス、10 g/l カザミノ酸、5 g/l 硫酸アンモニウム、3 g/l リン酸二水素カリウム、1 g/l リン酸水素二カリウム、0.5 g/l 硫酸マグネシウム七水和物、100 mg/l アンピシリン) を張り込んだ普通試験管に一白金耳植菌し、25℃、20 時間の本培養を行った。培養液 1 ml あたり 2.1 U の L-アラニル-L-グルタミン生成活性を有しており、クローニングした遺伝子がエシェリヒア コリで発現したことを確認した。なお、対照として pTrpT のみを導入した形質転換体には、活性は検出されなかった。

【0176】

(シグナル配列予測)

配列表に記載の配列番号 12 番のアミノ酸配列を SignalP v1.1 プログラム (Protein Engineering, vol12, no.1, pp.3-9, 1999) にて解析したところ、アミノ酸配列の 1-20 番目までがシグナルとして機能してペリプラスムに分泌すると

予測され、成熟タンパクは 2 1 番目より下流であると推定された。

【 0 1 7 7 】

【発明の効果】

本発明により、保護基の導入・脱離などの複雑な合成方法を軽減し、簡便かつ高収率で安価にペプチドを製造することができる新規酵素が提供される。本発明の酵素を用いることにより、効率的なペプチドの工業生産が可能である。

【 0 1 7 8 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., LTD.)

<120> 新規ペプチド生成酵素遺伝子

<130> PAMA-15008

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Empedobacter brevis

<220>

<223> Inventor: HARA, Seiichi

Inventor: YOKOZEKI, Kenzo

Inventor: ABE, Isao

Inventor: TONOUCHI, Naoto

Inventor: JOJIMA, Yasuko

<400> 1

Leu Phe Thr Ala Ile Tyr Gln Pro Lys

1

5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Empedobacter brevis

<400> 2

Thr Asn Val Thr Tyr Thr Met Pro Asp

1

5

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

primer 1

<400> 3

ttyacngcna thtaycarcc

20

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
primer 2

<400> 4

tcnggcatng trtangtnac rtt

23

<210> 5

<211> 2024

<212> DNA

<213> Empedobacter brevis

<220>

<221> CDS

<222> (61)..(1908)

<223> gene coding peptide synthase

<400> 5

atttccttaat aaaaactgaa atcttaatac atttatacta tcgtaaaatt tattgaacac 60

gtg aaa aaa tta aca tta aaa gta act cta ctt aca ctt ttg ttg gga 108

Val Lys Lys Leu Thr Leu Lys Val Thr Leu Leu Thr Leu Leu Gly

1	5	10	15	
agt aca gtt gga ttt gcg caa gat gca aaa gca gat tct gct tat gtg Ser Thr Val Gly Phe Ala Gln Asp Ala Lys Ala Asp Ser Ala Tyr Val				156
20	25	30		
cgc gac aat tac gaa aaa ata gaa caa gta att ccg atg cgc gat ggt Arg Asp Asn Tyr Glu Lys Ile Glu Gln Val Ile Pro Met Arg Asp Gly				204
35	40	45		
aca aag tta ttt aca gct att tat cag cca aaa gat aaa aca aaa caa Thr Lys Leu Phe Thr Ala Ile Tyr Gln Pro Lys Asp Lys Thr Lys Gln				252
50	55	60		
tat ccc gtt ttg tta aat cgt acg cct tat aca gtt gcg cct tat ggt Tyr Pro Val Leu Leu Asn Arg Thr Pro Tyr Thr Val Ala Pro Tyr Gly				300
65	70	75	80	
gta aat gaa tac aag aaa tcg tta gga aat ttt cct aca gaa atg cgc Val Asn Glu Tyr Lys Lys Ser Leu Gly Asn Phe Pro Thr Glu Met Arg				348
85	90	95		
gaa ggt ttt att ttt gtt tac caa gat gtg aga gga aaa tgg atg agc Glu Gly Phe Ile Phe Val Tyr Gln Asp Val Arg Gly Lys Trp Met Ser				396
100	105	110		
gaa ggc gaa ttt gaa gat gtt cga cct ata aat cct tca aaa agt aaa Glu Gly Glu Phe Glu Asp Val Arg Pro Ile Asn Pro Ser Lys Ser Lys				444
115	120	125		

aag gca att gac gaa agc aca gat aca ttt gat acg cta gaa tgg ctt 492

Lys Ala Ile Asp Glu Ser Thr Asp Thr Phe Asp Thr Leu Glu Trp Leu

130

135

140

gct aaa aac ttg aag aat tac acg aaa aaa gct gga att tat gga att 540

Ala Lys Asn Leu Lys Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Gly Ile Tyr Gly Ile

145

150

155

160

tcg tat cct ggt ttt tat tcg aca atg agt ttg gtt aat tcg cat cca 588

Ser Tyr Pro Gly Phe Tyr Ser Thr Met Ser Leu Val Asn Ser His Pro

165

170

175

act cta aaa gcc gtt tcg cca caa gcg ccc gtt acc aat tgg ttt tta 636

Thr Leu Lys Ala Val Ser Pro Gln Ala Pro Val Thr Asn Trp Phe Leu

180

185

190

ggt gac gat ttt cat cat aat gga gtt tta ttc ttg aat gat tct ttc 684

Gly Asp Asp Phe His His Asn Gly Val Leu Phe Leu Asn Asp Ser Phe

195

200

205

tca ttt atg act ttt ttt ggt gta aaa cgt ccg caa cca att acg cca 732

Ser Phe Met Thr Phe Phe Gly Val Lys Arg Pro Gln Pro Ile Thr Pro

210

215

220

gat aaa ggt ccg aaa cgt ttt gaa tat cca ata aaa gat aat tat aga 780

Asp Lys Gly Pro Lys Arg Phe Glu Tyr Pro Ile Lys Asp Asn Tyr Arg

225

230

235

240

ttt tat gca agt ggc tct gta aaa gag ttg aaa gat aaa tat ttg caa 828

Phe Tyr Ala Ser Gly Ser Val Lys Glu Leu Lys Asp Lys Tyr Leu Gln

245

250

255

gat aat atc aag ttt tac aat gat tta ttt gcg cat cca gat tac gat 876

Asp Asn Ile Lys Phe Tyr Asn Asp Leu Phe Ala His Pro Asp Tyr Asp

260

265

270

caa ttt tgg caa gat cgt aat gtt tta cca cat tta act aac gtg caa 924

Gln Phe Trp Gln Asp Arg Asn Val Leu Pro His Leu Thr Asn Val Gln

275

280

285

cct gct gta atg acg gtt gga ggt ttt ttt gat gca gaa gat gtc tac 972

Pro Ala Val Met Thr Val Gly Gly Phe Phe Asp Ala Glu Asp Val Tyr

290

295

300

ggc gct ttc gaa acg tat aaa gca att gag aaa caa aat ccg aaa gca 1020

Gly Ala Phe Glu Thr Tyr Lys Ala Ile Glu Lys Gln Asn Pro Lys Ala

305

310

315

320

aca aat att atg gtt gcc gga cct tgg ttt cat ggt ggt tgg gtt cgt 1068

Thr Asn Ile Met Val Ala Gly Pro Trp Phe His Gly Gly Trp Val Arg

325

330

335

agc aac gga agt act ttt gga gat atg caa ttt gca tcg aat aca agt 1116

Ser Asn Gly Ser Thr Phe Gly Asp Met Gln Phe Ala Ser Asn Thr Ser

340

345

350

gag cat tat cag caa gaa ata gaa ttg cct ttt ttt aat tat tac tta 1164

Glu His Tyr Gln Gln Glu Ile Glu Leu Pro Phe Phe Asn Tyr Tyr Leu
355 360 365

aaa gat aaa ggt aat ttt aaa cca acc gaa gct aca att ttt att acg 1212
Lys Asp Lys Gly Asn Phe Lys Pro Thr Glu Ala Thr Ile Phe Ile Thr
370 375 380

gga tct aac gaa tgg aaa caa ttt gat gct tgg cca cca aaa aat gta 1260
Gly Ser Asn Glu Trp Lys Gln Phe Asp Ala Trp Pro Pro Lys Asn Val
385 390 395 400

aca aca caa aaa att tat ttg caa caa aat ggt aaa ata gct ttt aat 1308
Thr Thr Gln Lys Ile Tyr Leu Gln Gln Asn Gly Lys Ile Ala Phe Asn
405 410 415

aaa acc aat aca aca act act ttt gac gaa tat gtt gca gat cca aat 1356
Lys Thr Asn Thr Thr Thr Thr Phe Asp Glu Tyr Val Ala Asp Pro Asn
420 425 430

tct cca gtt cct tat tca gga gga gtt tta gaa act cgt tca aga gaa 1404
Ser Pro Val Pro Tyr Ser Gly Gly Val Leu Glu Thr Arg Ser Arg Glu
435 440 445

tat atg gtc gat gat caa cgc ttt gct tct act cgt cct gat gtt atg 1452
Tyr Met Val Asp Asp Gln Arg Phe Ala Ser Thr Arg Pro Asp Val Met
450 455 460

gtg tat caa tct gat att ttg aca gaa gat att acg ctt gct ggt cct 1500
Val Tyr Gln Ser Asp Ile Leu Thr Glu Asp Ile Thr Leu Ala Gly Pro

465	470	475	480
gtt atc aat cat tta gtg gtt tct act acg gga aca gac gct gat tat 1548			
Val Ile Asn His Leu Val Val Ser Thr Thr Gly Thr Asp Ala Asp Tyr			
485	490	495	
gtt gta aaa ttg att gat gtt tat cct gaa aac acg cca aaa ttt aat 1596			
Val Val Lys Leu Ile Asp Val Tyr Pro Glu Asn Thr Pro Lys Phe Asn			
500	505	510	
aac aaa tta atg gct gga tat caa aat ttg att cgt gca gaa att atg 1644			
Asn Lys Leu Met Ala Gly Tyr Gln Asn Leu Ile Arg Ala Glu Ile Met			
515	520	525	
cgc gga aaa tat aga aat agt ttc tct aac ccc gaa gct atg gtt ccg 1692			
Arg Gly Lys Tyr Arg Asn Ser Phe Ser Asn Pro Glu Ala Met Val Pro			
530	535	540	
aat aaa gaa aca aat gta acg tac acg atg cca gat gtt gga cat aca 1740			
Asn Lys Glu Thr Asn Val Thr Tyr Thr Met Pro Asp Val Gly His Thr			
545	550	555	560
ttt aag aaa gga cat cgc att atg att caa gtt cag aac agt tgg ttt 1788			
Phe Lys Lys Gly His Arg Ile Met Ile Gln Val Gln Asn Ser Trp Phe			
565	570	575	
cct tta gca gat cgc aat ccg caa caa ttt atg aat gtt tac gaa gca 1836			
Pro Leu Ala Asp Arg Asn Pro Gln Gln Phe Met Asn Val Tyr Glu Ala			
580	585	590	

act tct aaa gat tat tta aaa caa acg caa cga att tat cat act tct 1884

Thr Ser Lys Asp Tyr Leu Lys Gln Thr Gln Arg Ile Tyr His Thr Ser

595

600

605

tat atc gaa att ccg gta ttg aaa taacaaaaaa atccagctaa ttagctggat 1938

Tyr Ile Glu Ile Pro Val Leu Lys

610

615

tttttttata atgttacttt tcctatTTTT cctttatttc caactaaaat tacatatTTT 1998

ttatcgggcg aaaccgtaca agtatg -

2024

<210> 6

<211> 616

<212> PRT

<213> Empedobacter brevis

<400> 6

Val Lys Lys Leu Thr Leu Lys Val Thr Leu Leu Thr Leu Leu Leu Gly

1

5

10

15

Ser Thr Val Gly Phe Ala Gln Asp Ala Lys Ala Asp Ser Ala Tyr Val

20

25

30

Arg Asp Asn Tyr Glu Lys Ile Glu Gln Val Ile Pro Met Arg Asp Gly

35

40

45

Thr Lys Leu Phe Thr Ala Ile Tyr Gln Pro Lys Asp Lys Thr Lys Gln
50 55 60

Tyr Pro Val Leu Leu Asn Arg Thr Pro Tyr Thr Val Ala Pro Tyr Gly
65 70 75 80

Val Asn Glu Tyr Lys Lys Ser Leu Gly Asn Phe Pro Thr Glu Met Arg
85 90 95

Glu Gly Phe Ile Phe Val Tyr Gln Asp Val Arg Gly Lys Trp Met Ser
100 105 110

Glu Gly Glu Phe Glu Asp Val Arg Pro Ile Asn Pro Ser Lys Ser Lys
115 120 125

Lys Ala Ile Asp Glu Ser Thr Asp Thr Phe Asp Thr Leu Glu Trp Leu
130 135 140

Ala Lys Asn Leu Lys Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Gly Ile Tyr Gly Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Pro Gly Phe Tyr Ser Thr Met Ser Leu Val Asn Ser His Pro
165 170 175

Thr Leu Lys Ala Val Ser Pro Gln Ala Pro Val Thr Asn Trp Phe Leu
180 185 190

Gly Asp Asp Phe His His Asn Gly Val Leu Phe Leu Asn Asp Ser Phe
195 200 205

Ser Phe Met Thr Phe Phe Gly Val Lys Arg Pro Gln Pro Ile Thr Pro
210 215 220

Asp Lys Gly Pro Lys Arg Phe Glu Tyr Pro Ile Lys Asp Asn Tyr Arg
225 230 235 240

Phe Tyr Ala Ser Gly Ser Val Lys Glu Leu Lys Asp Lys Tyr Leu Gln
245 250 255

Asp Asn Ile Lys Phe Tyr Asn Asp Leu Phe Ala His Pro Asp Tyr Asp
260 265 270

Gln Phe Trp Gln Asp Arg Asn Val Leu Pro His Leu Thr Asn Val Gln
275 280 285

Pro Ala Val Met Thr Val Gly Gly Phe Phe Asp Ala Glu Asp Val Tyr
290 295 300

Gly Ala Phe Glu Thr Tyr Lys Ala Ile Glu Lys Gln Asn Pro Lys Ala
305 310 315 320

Thr Asn Ile Met Val Ala Gly Pro Trp Phe His Gly Gly Trp Val Arg
325 330 335

Ser Asn Gly Ser Thr Phe Gly Asp Met Gln Phe Ala Ser Asn Thr Ser
340 345 350

Glu His Tyr Gln Gln Glu Ile Glu Leu Pro Phe Phe Asn Tyr Tyr Leu

355 360 365

Lys Asp Lys Gly Asn Phe Lys Pro Thr Glu Ala Thr Ile Phe Ile Thr
370 375 380

Gly Ser Asn Glu Trp Lys Gln Phe Asp Ala Trp Pro Pro Lys Asn Val
385 390 395 400

Thr Thr Gln Lys Ile Tyr Leu Gln Gln Asn Gly Lys Ile Ala Phe Asn
405 410 415

Lys Thr Asn Thr Thr Thr Thr Phe Asp Glu Tyr Val Ala Asp Pro Asn
420 425 430

Ser Pro Val Pro Tyr Ser Gly Gly Val Leu Glu Thr Arg Ser Arg Glu
435 440 445

Tyr Met Val Asp Asp Gln Arg Phe Ala Ser Thr Arg Pro Asp Val Met
450 455 460

Val Tyr Gln Ser Asp Ile Leu Thr Glu Asp Ile Thr Leu Ala Gly Pro
465 470 475 480

Val Ile Asn His Leu Val Val Ser Thr Thr Gly Thr Asp Ala Asp Tyr
485 490 495

Val Val Lys Leu Ile Asp Val Tyr Pro Glu Asn Thr Pro Lys Phe Asn
500 505 510

Asn Lys Leu Met Ala Gly Tyr Gln Asn Leu Ile Arg Ala Glu Ile Met
515 520 525

Arg Gly Lys Tyr Arg Asn Ser Phe Ser Asn Pro Glu Ala Met Val Pro
530 535 540

Asn Lys Glu Thr Asn Val Thr Tyr Thr Met Pro Asp Val Gly His Thr
545 550 555 560

Phe Lys Lys Gly His Arg Ile Met Ile Gln Val Gln Asn Ser Trp Phe
565 570 575

Pro Leu Ala Asp Arg Asn Pro Gln Gln Phe Met Asn Val Tyr Glu Ala
580 585 590

Thr Ser Lys Asp Tyr Leu Lys Gln Thr Gln Arg Ile Tyr His Thr Ser
595 600 605

Tyr Ile Glu Ile Pro Val Leu Lys
610 615

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
primer for preparation of pTrpT

<400> 7

gtatcacgag gccctagctg tgggtgcatg gtcggtgac

40

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
primer for preparation of pTrpT

<400> 8

ttcggggatt ccatatgata ccctttttac gtgaacttgc

40

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthrsized
primer for preparation of pTrpT_Gtg2

<400> 9

gggaattcca tatgaaaaaa ttaacattaa aagtaact

38

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
primer for preparation of pTrpT_Gtg2

<400> 10

gggggctgca gtacttgtac ggtttcgccc gataaa

36

<210> 11

<211> 1935

<212> DNA

<213> Sphingobacterium sp.

<220>

<221> CDS

<222> (61)..(1917)

<223> gene of peptide synthase

<400> 11

gaaaccaagt gtaaaattat aatttacacc aaagaatgta ctgaacaaat aattatctga 60

atg aaa aat aca att tcg tgc cta act tta gcg ctt tta agc gca agc 108

Met Lys Asn Thr Ile Ser Cys Leu Thr Leu Ala Leu Leu Ser Ala Ser

1

5

10

15

cag tta cat gct caa aca gct gcc gac tcg gct tat gtt aga gat cat 156

Gln Leu His Ala Gln Thr Ala Ala Asp Ser Ala Tyr Val Arg Asp His

20

25

30

tat gaa aag acc gaa gta gca att ccc atg cga gat ggg aaa aaa tta 204

Tyr Glu Lys Thr Glu Val Ala Ile Pro Met Arg Asp Gly Lys Lys Leu

35

40

45

ttt act gcg atc tac agt cca aaa gac aaa tcc aag aaa tat cca gtt 252

Phe Thr Ala Ile Tyr Ser Pro Lys Asp Lys Ser Lys Lys Tyr Pro Val

50

55

60

ttg ctc aat aga acg ccc tac acg gtt tca cct tat ggg cag aac gaa 300

Leu Leu Asn Arg Thr Pro Tyr Thr Val Ser Pro Tyr Gly Gln Asn Glu

65

70

75

80

tat aaa aaa agc ttg gga aac ttt ccc caa atg atg cgt gaa ggc tat 348

Tyr Lys Lys Ser Leu Gly Asn Phe Pro Gln Met Met Arg Glu Gly Tyr

85

90

95

att ttc gtt tac cag gat gtc cgt ggc aag tgg atg agc gaa ggt gat 396

Ile Phe Val Tyr Gln Asp Val Arg Gly Lys Trp Met Ser Glu Gly Asp

100

105

110

ttt gaa gat ata cgt ccg acc acg tac agc aaa gat aaa aaa gca atc 444
Phe Glu Asp Ile Arg Pro Thr Thr Tyr Ser Lys Asp Lys Lys Ala Ile
115 120 125

gat gaa agt acg gat acc tat gat gcg ctt gaa tgg tta cag aaa aat 492
Asp Glu Ser Thr Asp Thr Tyr Asp Ala Leu Glu Trp Leu Gln Lys Asn
130 135 140

ctc aaa aac tat aat ggc aaa gcc ggg ctc tat ggg att tcc tat cca 540
Leu Lys Asn Tyr Asn Gly Lys Ala Gly Leu Tyr Gly Ile Ser Tyr Pro
145 150 155 160

ggc ttc tat tct acc gtc gga ttg gtc aaa aca cac ccg agc ttg aag 588
Gly Phe Tyr Ser Thr Val Gly Leu Val Lys Thr His Pro Ser Leu Lys
165 170 175

gca gtc tcc cca cag gct ccc gta aca gac tgg tat atc ggc gac gac 636
Ala Val Ser Pro Gln Ala Pro Val Thr Asp Trp Tyr Ile Gly Asp Asp
180 185 190

ttc cac cat aat ggc gta ttg ttt ctt cag gat gca ttt aca ttc atg 684
Phe His His Asn Gly Val Leu Phe Leu Gln Asp Ala Phe Thr Phe Met
195 200 205

tca acc ttt ggt gtc cct cgt cca aaa ccc att aca ccg gat caa ttt 732
Ser Thr Phe Gly Val Pro Arg Pro Lys Pro Ile Thr Pro Asp Gln Phe
210 215 220

aag ggc aaa att cag atc aaa gaa gcc gat aaa tat aac ttt ttt gca 780

Lys Gly Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ala Asp Lys Tyr Asn Phe Phe Ala
 225 230 235 240

gaa gca gga aca gcg cgg gaa ctc aaa gaa aag tat ttt ggt gac tcc 828
 Glu Ala Gly Thr Ala Arg Glu Leu Lys Glu Lys Tyr Phe Gly Asp Ser
 245 250 255

gta caa ttt tgg aat gac ctg ttt aag cat ccc gac tat gat gat ttt 876
 Val Gln Phe Trp Asn Asp Leu Phe Lys His Pro Asp Tyr Asp Asp Phe
 260 265 270

tgg aaa tcg cgt gtg atc acg aat tct tta cag gag gta aaa cca gct 924
 Trp Lys Ser Arg Val Ile Thr Asn Ser Leu Gln Glu Val Lys Pro Ala
 275 280 285

gtg atg gtg gtt ggt ggt ttc ttt gac gcg gaa gat gct tat gga aca 972
 Val Met Val Val Gly Gly Phe Phe Asp Ala Glu Asp Ala Tyr Gly Thr
 290 295 300

ttt aag acc tac caa tcg att gag gat aaa agc aaa aaa aac aac tcg 1020
 Phe Lys Thr Tyr Gln Ser Ile Glu Asp Lys Ser Lys Lys Asn Asn Ser
 305 310 315 320

att tta gtc gcg gga cct tgg tat cat ggc ggt tgg gtt cgt gca gaa 1068
 Ile Leu Val Ala Gly Pro Trp Tyr His Gly Gly Trp Val Arg Ala Glu
 325 330 335

gga aac tat tta ggt gat atc caa ttt gag aaa aaa acc agt att act 1116
 Gly Asn Tyr Leu Gly Asp Ile Gln Phe Glu Lys Lys Thr Ser Ile Thr

340	345	350	
tat cag gaa caa ttt gaa caa cca ttt ttc aaa tat tac cta aaa gat			1164
Tyr Gln Glu Gln Phe Glu Gln Pro Phe Phe Lys Tyr Tyr Leu Lys Asp			
355	360	365	
gaa gga aac ttc gcc cct tcc gaa gct aac att ttt gtt tca ggc agc			1212
Glu Gly Asn Phe Ala Pro Ser Glu Ala Asn Ile Phe Val Ser Gly Ser			
370	375	380	
aac gaa tgg aaa cat ttc gaa cag tgg cca cca aaa aat gta gag aca			1260
Asn Glu Trp Lys His Phe Glu Gln Trp Pro Pro Lys Asn Val Glu Thr			
385	390	395	400
aaa aaa cta tac ttc caa cct cag ggg aaa ctt gga ttt gac aaa gtt			1308
Lys Lys Leu Tyr Phe Gln Pro Gln Gly Lys Leu Gly Phe Asp Lys Val			
405	410	415	
caa cgt aca gat tcc tgg gat gaa tat gta aca gac cct aat aaa cct			1356
Gln Arg Thr Asp Ser Trp Asp Glu Tyr Val Thr Asp Pro Asn Lys Pro			
420	425	430	
gtt ccg cat caa ggt ggg gta att caa aac cga aca cgg gag tat atg			1404
Val Pro His Gln Gly Gly Val Ile Gln Asn Arg Thr Arg Glu Tyr Met			
435	440	445	
gta gat gat caa cgt ttc gcg gct agt cgc cct gat gtc atg gtt tat			1452
Val Asp Asp Gln Arg Phe Ala Ala Ser Arg Pro Asp Val Met Val Tyr			
450	455	460	

caa acg gaa ccg ttg acg gag gac ctg acg ata gta ggc cca atc aaa 1500

Gln Thr Glu Pro Leu Thr Glu Asp Leu Thr Ile Val Gly Pro Ile Lys

465 470 475 480

aac ttt ctc aaa gtt tct tca aca gga aca gac gcg gac tat gtt gtc 1548

Asn Phe Leu Lys Val Ser Ser Thr Gly Thr Asp Ala Asp Tyr Val Val

485 490 495

aaa ctg att gac gtt tat ccg aat gat gca gca agt tat caa gga aaa 1596

Lys Leu Ile Asp Val Tyr Pro Asn Asp Ala Ala Ser Tyr Gln Gly Lys

500 505 510

aca atg gct gga tat caa atg atg gta cgt ggt gag atc atg gcg ggg 1644

Thr Met Ala Gly Tyr Gln Met Met Val Arg Gly Glu Ile Met Ala Gly

515 520 525

aaa tac cga aat ggt ttc gat aaa gcg cag gcc ttg act cca ggt atg 1692

Lys Tyr Arg Asn Gly Phe Asp Lys Ala Gln Ala Leu Thr Pro Gly Met

530 535 540

gtc gaa aag gtg aat ttt gaa atg cca gac gtt gcg cat acc ttc aaa 1740

Val Glu Lys Val Asn Phe Glu Met Pro Asp Val Ala His Thr Phe Lys

545 550 555 560

aaa gga cat cgc att atg gtt cag gta caa aac tca tgg ttt ccg ctg 1788

Lys Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Gln Asn Ser Trp Phe Pro Leu

565 570 575

gca gaa cga aat cca cag gtg ttt tta gca cct tat aca gct acc aaa 1836

Ala Glu Arg Asn Pro Gln Val Phe Leu Ala Pro Tyr Thr Ala Thr Lys

580

585

590

gct gat ttc cgc aaa gct acc caa cgt att ttt cac gat gtg aac aat 1884

Ala Asp Phe Arg Lys Ala Thr Gln Arg Ile Phe His Asp Val Asn Asn

595

600

605

gcc aca tac atc gaa ttt tct gtc ctc aaa gat tagcaggtaa attcgaaa 1935

Ala Thr Tyr Ile Glu Phe Ser Val Leu Lys Asp

610

615

<210> 12

<211> 619

<212> PRT

<213> Sphingobacterium sp.

<400> 12

Met Lys Asn Thr Ile Ser Cys Leu Thr Leu Ala Leu Leu Ser Ala Ser

1

5

10

15

Gln Leu His Ala Gln Thr Ala Ala Asp Ser Ala Tyr Val Arg Asp His

20

25

30

Tyr Glu Lys Thr Glu Val Ala Ile Pro Met Arg Asp Gly Lys Lys Leu

35

40

45

Phe Thr Ala Ile Tyr Ser Pro Lys Asp Lys Ser Lys Lys Tyr Pro Val

出証特 2 0 0 4 - 3 0 0 8 1 1 5

Ser Thr Phe Gly Val Pro Arg Pro Lys Pro Ile Thr Pro Asp Gln Phe
210 215 220

Lys Gly Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ala Asp Lys Tyr Asn Phe Phe Ala
225 230 235 240

Glu Ala Gly Thr Ala Arg Glu Leu Lys Glu Lys Tyr Phe Gly Asp Ser
245 250 255

Val Gln Phe Trp Asn Asp Leu Phe Lys His Pro Asp Tyr Asp Asp Phe
260 265 270

Trp Lys Ser Arg Val Ile Thr Asn Ser Leu Gln Glu Val Lys Pro Ala
275 280 285

Val Met Val Val Gly Gly Phe Phe Asp Ala Glu Asp Ala Tyr Gly Thr
290 295 300

Phe Lys Thr Tyr Gln Ser Ile Glu Asp Lys Ser Lys Lys Asn Asn Ser
305 310 315 320

Ile Leu Val Ala Gly Pro Trp Tyr His Gly Gly Trp Val Arg Ala Glu
325 330 335

Gly Asn Tyr Leu Gly Asp Ile Gln Phe Glu Lys Lys Thr Ser Ile Thr
340 345 350

Tyr Gln Glu Gln Phe Glu Gln Pro Phe Phe Lys Tyr Tyr Leu Lys Asp
355 360 365

Glu Gly Asn Phe Ala Pro Ser Glu Ala Asn Ile Phe Val Ser Gly Ser
370 375 380

Asn Glu Trp Lys His Phe Glu Gln Trp Pro Pro Lys Asn Val Glu Thr
385 390 395 400

Lys Lys Leu Tyr Phe Gln Pro Gln Gly Lys Leu Gly Phe Asp Lys Val
405 410 415

Gln Arg Thr Asp Ser Trp Asp Glu Tyr Val Thr Asp Pro Asn Lys Pro
420 425 430

Val Pro His Gln Gly Gly Val Ile Gln Asn Arg Thr Arg Glu Tyr Met
435 440 445

Val Asp Asp Gln Arg Phe Ala Ala Ser Arg Pro Asp Val Met Val Tyr
450 455 460

Gln Thr Glu Pro Leu Thr Glu Asp Leu Thr Ile Val Gly Pro Ile Lys
465 470 475 480

Asn Phe Leu Lys Val Ser Ser Thr Gly Thr Asp Ala Asp Tyr Val Val
485 490 495

Lys Leu Ile Asp Val Tyr Pro Asn Asp Ala Ala Ser Tyr Gln Gly Lys
500 505 510

Thr Met Ala Gly Tyr Gln Met Met Val Arg Gly Glu Ile Met Ala Gly

515

520

525

Lys Tyr Arg Asn Gly Phe Asp Lys Ala Gln Ala Leu Thr Pro Gly Met

530

535

540

Val Glu Lys Val Asn Phe Glu Met Pro Asp Val Ala His Thr Phe Lys

545

550

555

560

Lys Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Gln Asn Ser Trp Phe Pro Leu

565

570

575

Ala Glu Arg Asn Pro Gln Val Phe Leu Ala Pro Tyr Thr Ala Thr Lys

580

585

590

Ala Asp Phe Arg Lys Ala Thr Gln Arg Ile Phe His Asp Val Asn Asn

595

600

605

Ala Thr Tyr Ile Glu Phe Ser Val Leu Lys Asp

610

615

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

primer for preparation of pTrpT_Sm_aet

<400> 13

gggaattcca tatgaaaaat acaatttcgt

30

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

primer for preparation of pTrpT_Sm_aet

<400> 14

gctctagact aatcttttgag gacagaaaa

29

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明のエンペドバクターの酵素の至適 p H を示す図である。

【図 2】

本発明のエンペドバクターの酵素の至適温度を示す図である。

【図 3】

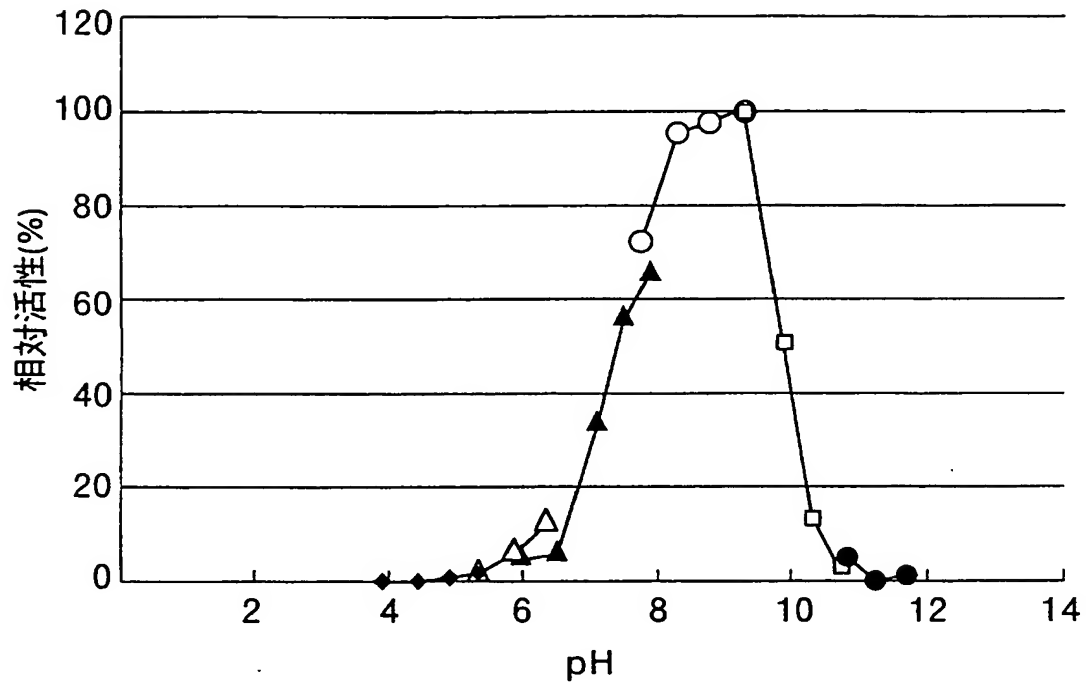
L - アラニンメチルエステルと L - グルタミンからの L - アラニル - L - グルタミン生成の経時変化を示す図である。

【図 4】

サイトプラズム画分 (Cy) とペリプラズム画分 (Pe) に存在する酵素量を示す図である。

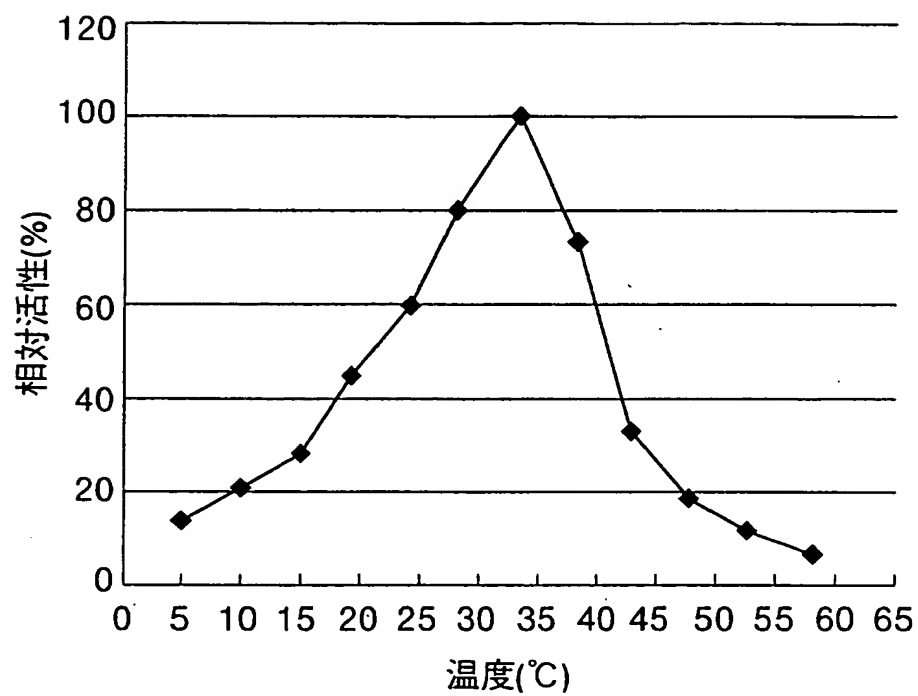
【書類名】 図面

【図 1】

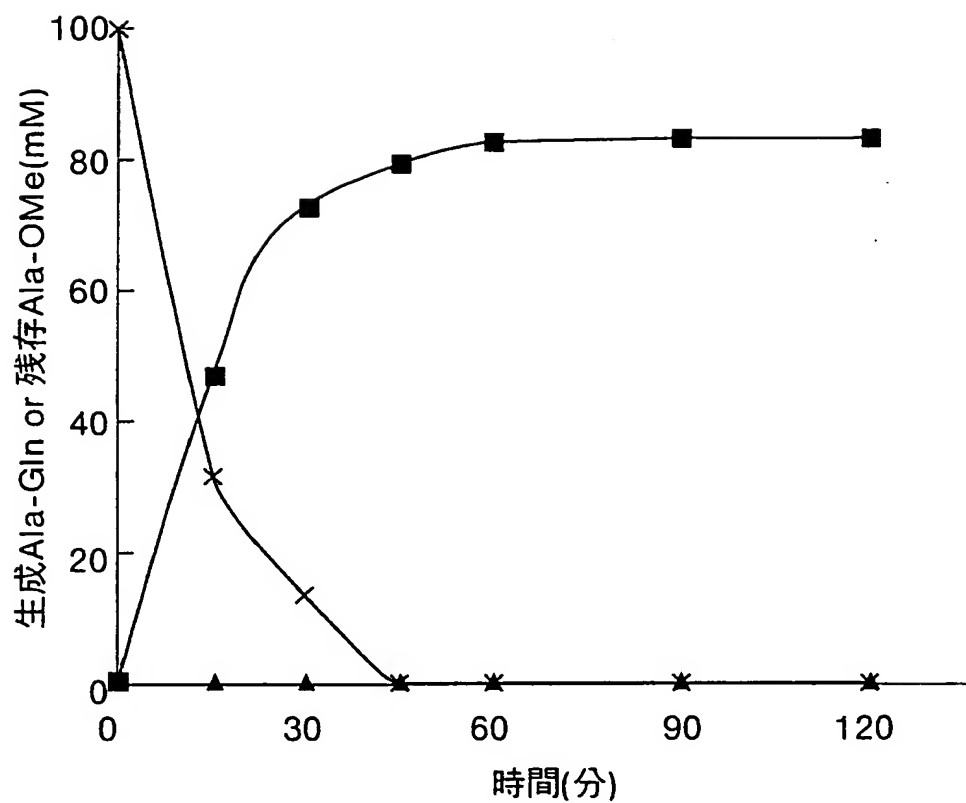


- ◆ : 酢酸緩衝液(pH3.9~5.4)
- △ : MES緩衝液(pH5.4~6.4)
- ▲ : リン酸緩衝液(pH6.0~7.9)
- : ホウ酸緩衝液(pH7.8~9.3)
- : CAPS緩衝液(pH9.3~10.7)
- : K₂HPO₄-NaOH緩衝液(pH10.8~11.6)

【図 2】

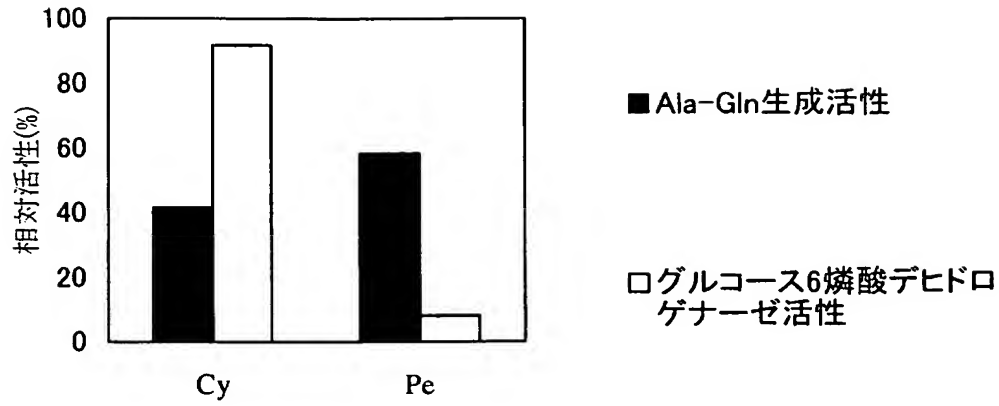


【図 3】



- : 酵素添加区での生成L-Ala-L-Gln
× : 酵素添加区での残存L-Ala-OMe
▲ : 酵素無添加区での生成L-Ala-L-Gln

【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、複雑な合成方法を経ることなく、簡便かつ高収率で安価にペプチドを製造できる新規酵素に関する。より詳細には、カルボキシ成分とアミン成分とからのペプチド合成反応を触媒する新規酵素、この酵素を生産する微生物、およびこの酵素もしくは微生物を使用する安価なペプチドの製造方法を提供することである。

【解決手段】 新たに見出したエンペドバクター属に属する細菌からペプチドを効率良く合成する新規酵素を見出し、安価かつ簡便にペプチドを製造する方法を見出した。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 1 6 7 6 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 0 6 6]

1. 変更年月日

1 9 9 1 年 7 月 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号

氏 名

味の素株式会社